

# **Untersuchungen zur genetischen Stabilität von normalen humanen Fibroblasten nach Einwirkung von dicht-ionisierender Strahlung**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Ing. Biotechnologie (FH) Sebastian Zahnreich

aus Hadamar

Berichterstatter: Prof. Dr. Marco Durante

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Marcus Löbrich

Tag der Einreichung: 14.12.2010

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2011

Darmstadt 2011

D 17



<b>Zusammenfassung</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>1. Einleitung</b> .....	9
1.1 Physikalische Eigenschaften ionisierender Strahlung.....	9
1.1.1 Dünn-ionisierende Strahlung.....	9
1.1.2 Dicht-ionisierende Strahlung .....	11
1.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung.....	14
1.2.1 Schädigung der DNA .....	14
1.3 Fibroblasten als Modellsystem .....	16
1.4 Inhibierung der Zellzyklusprogression .....	18
1.4.1 Inhibierung der Zellzyklusprogression nach Bestrahlung.....	20
1.5 Alterung und Seneszenz von Fibroblasten .....	21
1.6 Strahleninduzierte genomische Instabilität und Tumorentstehung.....	23
1.7 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies .....	26
1.8 Zielsetzung der Arbeit .....	28
<b>2. Material und Methoden</b> .....	30
2.1 Zellen und Kultivierungsmethoden .....	30
2.1.1 Verwendete Zellen .....	30
2.1.2 Langzeitkultivierung und Lagerung der Zellen .....	31
2.1.3 Altersbestimmung von Fibroblasten .....	32
2.2 Bestrahlungsexperimente.....	32
2.2.1 Experimenteller Ablauf der Bestrahlungsexperimente für die Bestimmung intrazellulärer ROS-Mengen.....	33
2.2.2 Experimentelle Abläufe der Bestrahlungsexperimente der Untersuchungen zur genomischen Stabilität in den Nachkommen bestrahlter Zellen .....	33
2.2.3 Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung.....	37
2.2.4 Bestrahlung der Zellen mit Kohlenstoff-Ionen.....	37

2.3 Analysenmethoden.....	41
2.3.1 Zellinaktivierung durch Bestrahlung .....	41
2.3.2 Bestimmung intrazellulärer ROS-Mengen .....	42
2.3.3 Chromosomenanalysen .....	47
2.3.4 Proteindetektion von Zellextrakten .....	61
2.3.5 Proteindetektion mittels der In Cell Western-Methode .....	63
2.4 Statistische Analyse der Daten.....	65
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
3.1 Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten.....	69
3.1.1 Langzeitentwicklung von NHDF-Zellen.....	70
3.1.2 Langzeitentwicklung von IMR-90-Zellen.....	84
3.1.3 Langzeitentwicklung von AG1522D-Zellen.....	93
3.2 Langzeitentwicklung in Nachkommen bestrahlter Fibroblasten.....	98
3.2.1 Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen.....	98
3.2.2 Zytogenetische Veränderungen in Kolonien schein-bestrahlter Fibroblasten.....	99
3.2.3 Zytogenetische Veränderungen in Kolonien der Nachkommen mit Röntgenstrahlung bestrahlten Fibroblasten.....	103
3.2.4 Zytogenetische Veränderungen der Nachkommen gezielt mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten in Kolonien .....	110
3.2.5 Entwicklung der Proteinexpression in klonogenen Nachkommen von Fibroblasten nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen.....	118
3.2.6 Langzeitentwicklung von Fibroblasten nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion in Massenkulturen.....	122
3.3 ROS-Akkumulation nach Bestrahlung .....	128
3.3.1 Relatives Zellüberleben nach Bestrahlung .....	129
3.3.2 Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in IMR-90-Zellen nach Bestrahlung .....	130
3.3.3 Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in WI-38-Zellen nach Bestrahlung .....	133



3.3.4 Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in AG1522D-Zellen nach Bestrahlung .....	135
3.3.5 Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation nach Bestrahlung .....	138
<b>4. Diskusssion .....</b>	<b>141</b>
4.1 Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten .....	142
4.1.1 Proliferation normaler humaner Fibroblasten in Langzeitkulturen .....	142
4.1.2 Zytogenetische Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten.....	144
4.1.3 Langzeitentwicklung der Proteinexpression normaler humaner Fibroblasten .....	156
4.1.4 Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation in normalen humanen Fibroblasten	159
4.1.5 Schlussfolgerung: Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten.....	161
4.2 Zelluläre Veränderungen in bestrahlten Fibroblasten und deren Nachkommen.....	163
4.2.1 Zellüberleben von AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen.....	165
4.2.2 Direkte Chromosomenschäden in AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion.....	167
4.2.3 Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter AG1522D-Zellen in Kolonien	170
4.3.3 Entwicklung der Proteinexpression in klonogenen Nachkommen von AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen .....	181
4.3 Langzeitentwicklung von AG5122D-Zellen nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion in Massenkulturen .....	183
4.3.1 Proliferation der Nachkommen gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten AG1522D-Zellen in Massenkulturen.....	185
4.3.2 Zytogenetische Veränderungen in Nachkommen gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten AG1522D-Zellen in Massenkulturen .....	185
4.3.3 Langzeitentwicklung der Proteinexpression in gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten AG1522D-Zellen in Massenkulturen .....	186
4.4 ROS-Akkumulation in Fibroblasten nach Bestrahlung .....	187
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick: Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten .....	190

<b>5. Anhang</b>	192
A.1 Chemikalien und Kits	192
A.2 Lösungen und Puffer	193
A.3 Medien und Seren für die Zellkultur	196
A.4 Antikörper	197
A.5 Nukleinsäuresonden	197
A.6 Verbrauchsmaterialien	197
A.7 Geräte und Software	198
 <b>Literaturverzeichnis</b>	 200
 <b>Abbildungsverzeichnis</b>	 219
 <b>Tabellenverzeichnis</b>	 222
 <b>Abkürzungsverzeichnis</b>	 223
 <b>Lebenslauf</b>	 224
 <b>Erklärung gemäß §9 der Promotionsordnung</b>	 225

## Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der genotoxischen Wirkung dicht-ionisierender Strahlung in den Nachkommen bestrahlter humaner Fibroblasten. Dabei sollte insbesondere die Entwicklung der genomischen Stabilität über die *in vitro* Lebensspanne untersucht werden, die in diesem Zelltyp durch beschleunigte Differenzierung und frühzeitigen Eintritt in die Seneszenz gewährleistet wird.

Um zellspezifische Entwicklungen besser abschätzen zu können, wurde zuerst die Langzeitentwicklung verschiedener Fibroblasten (Haut, Lunge, Vorhaut) ohne die Einwirkung ionisierender Strahlung charakterisiert. Zusammen mit Ergebnissen aus Vorarbeiten (Fournier *et al.* 2007) zeigte sich, dass in allen untersuchten Fibroblasten genomische Instabilität auftreten kann. Als eine typische Entwicklung von Fibroblasten hat sich eine mit dem Alter der Kultur zunehmende klonale Expansion von Zellen mit chromosomalen Aberrationen erwiesen. In einem Experiment (Haut) kam es zu Monosomien, insbesondere für Chromosom 6, die mit einer verlängerten replikativen Lebensspanne und deutlicher genomischer Instabilität einherging. Eine interessante Beobachtung war, dass im Laufe der Kultivierung spontan stark verkürzte Telomere oder Brüche in der Telomerregion einzelner Chromosomen auftraten. Besonders deutlich zeigte sich in Fibroblasten der Lunge, dass dabei das instabile Telomer eines Chromosoms durch Duplikationen terminaler Fragmente verschiedener Donorchromosomen wieder stabilisiert wurde. Ein solcher Mechanismus wurde in Hefe- und Tumorzellen als „break-induced replication“ beschrieben, aber in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal in normalen humanen Zellen als spontanes Ereignis beobachtet. Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um ein wichtiges Element zum Erhalt der genomischen Stabilität in Fibroblasten handelt.

Im Rahmen der Untersuchungen des genetischen Risikos für die Nachkommen von bestrahlten Fibroblasten zeigte sich, dass eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb weniger Tage nach Bestrahlung auftrat und dann wieder zurückging. Die Zunahme intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies geht auf strahleninduzierte Veränderungen des Zellmetabolismus zurück und verursacht chronische Schäden an der DNA und anderen Strukturen. Ein erneuter Anstieg in alternden Zellen wurde zwar festgestellt, dieser war aber unabhängig von einer vorherigen Bestrahlung und stand in keinem zeitlichen Zusammenhang zum Auftreten genomischer Instabilität. Dies zeigt, dass antioxidative Mechanismen in Fibroblasten bei akuter Schädigung durch Bestrahlung sehr wirksam sind und ebenfalls zur genomischen Stabilität der Zellen beitragen.

Dieser Arbeit vorangegangene Experimente haben gezeigt, dass genomische Stabilität in den Nachkommen bestrahlter Fibroblasten vor allem durch frühzeitige Differenzierung und Übergang in die replikative Seneszenz gewährleistet wird. Trotzdem wurden massive genomische Instabilität und Veränderungen der Zellzyklusregulierung nach Bestrahlung mit hohen

Dosen von Röntgenstrahlung, häufig in klonal expandierenden Zellen mit chromosomalen Aberrationen beobachtet. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, wie sich im Vergleich zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung die Bestrahlung mit dicht-ionisierenden Kohlenstoff-Ionen auswirkt.

Nach gezielter Bestrahlung aller Zellen mit einer definierten Anzahl (1 oder 5 Treffer) von Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] an der Mikrosonde der GSI konnte festgestellt werden, dass nach Durchgang eines einzelnen Kohlenstoff-Ions 70 % der Zellen im ersten Zellzyklus nach Bestrahlung chromosomale Schäden zeigten. 20% der Zellen überlebten klonogen und in 30% dieser Zellen wurden vererbare strahleninduzierte Aberrationen stabil an die direkten Nachkommen weitergeben. Zwar trat in den Nachkommen bestrahlter Zellen chromosomale Instabilität auf, das Ausmaß in Kontrollzellen wurde aber nicht überschritten. Die Zellzyklusregulierung war von der vorherigen Bestrahlung unbeeinflusst. Allerdings zeigte sich in den Nachkommen der gezielt mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Zellen ein im Vergleich zu Kontrollen verfrühter Übergang zu terminalen Differenzierungsstadien und Seneszenz. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass das Ausmaß genomischer Instabilität in diesen Zellen das Niveau von Kontrollzellen nicht übersteigt. Auch ist die Wahrung der genomischen Integrität durch verfrühten Übergang zu terminalen Differenzierungsstadien und Seneszenz effizienter als für Röntgenstrahlung, wenn man physikalische Dosen von Kohlenstoff-Ionen und Röntgenstrahlung vergleicht, die in Zellen direkt nach einer Bestrahlung ähnliche Effekte hervorrufen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts „Genetische Wirkung dicht-ionisierender Strahlung“ (Förderkennzeichen 02 S 8203/8497) durchgeführt.

Folgende Veröffentlichungen gingen aus dieser Arbeit hervor oder werden vorbereitet:

Zahnreich S., Melnikova L., Winter M., Nasonova E., Durante M., Ritter S., Fournier C.: “Radiation-induced premature senescence is associated with specific cytogenetic changes.” In: Mutation Research 701(1), 2010, S.60-66.

Zahnreich S., Krunić D., Boukamp P., Greulich-Bode K., Sabatier L., Melnikova L., Szejka A. Drossel B., Durante M., Ritter S. and Fournier C.: “Duplicated chromosomal fragments stabilize shortened telomeres in normal human IMR-90 cells before transition to senescence.” Wird eingereicht bei: Molecular and Cellular Biology.

## Abstract

The purpose of the present study was to investigate genotoxic effects of densely ionizing radiation in the descendants of irradiated human fibroblasts. Especially the genomic stability during the *in vitro* lifespan was examined which is ensured by accelerated differentiation and premature senescence in fibroblasts.

To assess differences in the long-term development of fibroblast strains, long-term cultures of three non-irradiated strains from different tissues of origin (skin, lung and foreskin) were analyzed. Including results from preceding works (Fournier *et al.* 2007), in all fibroblasts strains genomic instability was observed. Another typical cytogenetic feature of fibroblasts, clonal expansion of cells carrying chromosomal aberrations, occurred over the time of culturing. Monosomies developed (e.g. for chromosome 6) together with a prolonged life-span and severe genomic instability in one experiment (skin). Furthermore, considerably shortened telomeres or breaks in the telomeric region of single chromosomes occurred spontaneously during the period of culturing. As shown for lung fibroblasts, dysfunctional telomeres of a single chromosome were stabilized by duplications of terminal fragments of multiple donor-chromosomes. Such a phenomenon ("break-induced replication") has been described in yeast and tumor cells and, for the first time in the work at hand, in normal human cells. This mechanism may represent an important element to preserve chromosomal stability in fibroblasts.

In the context of investigations concerning the genetic risks in the progeny of cells exposed to densely-ionizing radiation, an accumulation of reactive oxygen species (ROS) was shown during the first days after irradiation followed by a decrease to the level of controls. This early radiation-induced accumulation of ROS goes back to alterations of the cellular metabolism and causes chronic damage to DNA and other cellular structures. An increase in *in vitro* aged fibroblasts was observed independent of a previous radiation exposure and in no temporal relation to genomic instability. Thus, anti-oxidative safeguard mechanisms are activated and effective after acute radiation-damage and contribute to the genomic stability of fibroblasts.

Former experiments showed that genomic stability is assured by premature differentiation and senescence in the descendants of irradiated fibroblasts. Nevertheless, severe genomic instability and impaired cell-cycle regulation was observed after irradiation with high doses of X-rays and frequently in clonally expanding cells carrying chromosomal aberrations. The aim of this study was to determine the different consequences of the exposure to densely-ionizing radiation compared to X-rays.

After targeted irradiation with a defined number (1 or 5 hits) of carbon-ions [4,8 MeV/u] at the microbeam facility at GSI, we could show that after the traversal of a single carbon-ion 70 % of the cells reaching the first cell-cycle showed chromosomal aberrations. 20 % of the trav-

## Abstract

ersed cells survived clonally and in 30 % of these cells transmissible radiation induced aberrations were passed to the clonal descendants. Although chromosomal instability occurred in the descendants of irradiated cells, the level of control cells was not exceeded. The regulation of the cell-cycle was not affected. However, the progeny of carbon-ion [4.8 MeV/u] irradiated cells underwent earlier differentiation and senescence compared to controls. This could be an important factor limiting the emergence of genomic instability in the progeny of cells irradiated with carbon-ions, not exceeding the level of controls. These results indicate that the protection of the integrity of the genome by premature differentiation and senescence seems to be more efficient when comparing physical doses of carbon-ions and X-rays, which in contrast lead to similar direct effects after irradiation.

## 1. Einleitung

### 1.1 Physikalische Eigenschaften ionisierender Strahlung

Strahlung, die beim Durchdringen von Materie Elektronen aus dem Molekül- oder Atomverband herausschlägt, wird als ionisierend bezeichnet. Dabei kommt es zur Zerstörung der kovalenten Verbindungen zwischen Atomen eines Moleküls und damit makromolekularer Strukturen. Die bei einer Bestrahlung absorbierte Energie einer ionisierenden Strahlung pro Masseinheit ist definiert als Energiedosis (Gray) und ergibt sich aus der folgenden Beziehung (ICRU-Report 1998):

$$D[Gy] = \frac{\Delta E[J]}{\Delta m[kg]} \quad (1.1)$$

D      Dosis

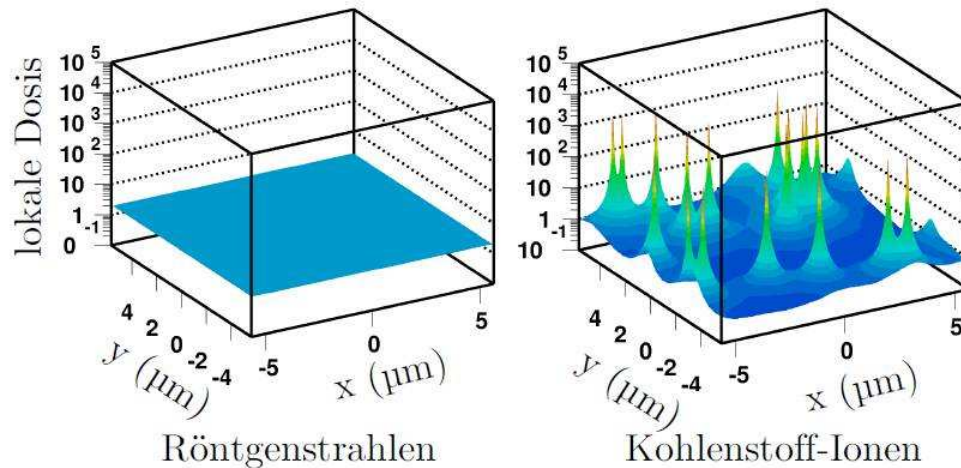
$\Delta E$     absorbierte Energie einer ionisierenden Strahlung

m      Masseinheit

#### 1.1.1 Dünn-ionisierende Strahlung

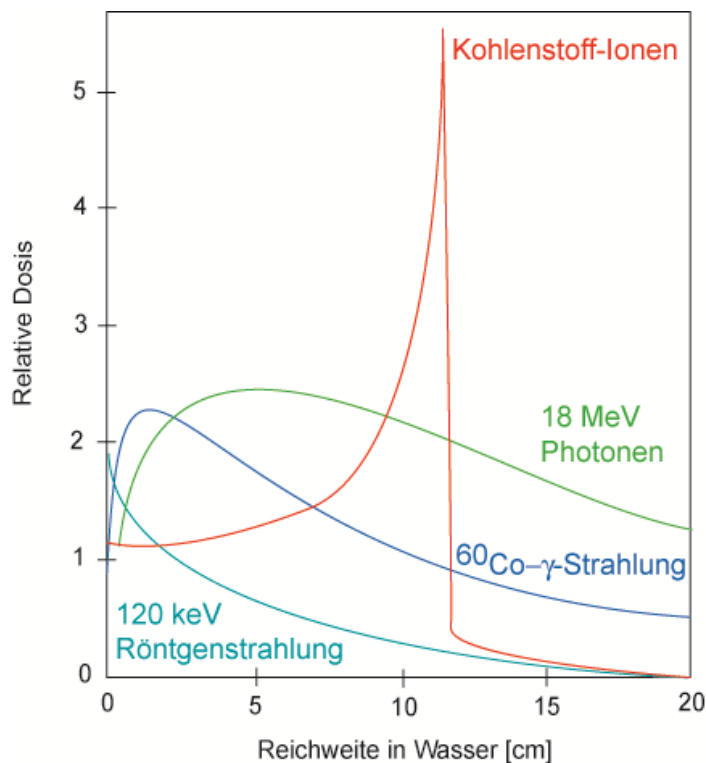
Zur dünn-ionisierenden Strahlung, auch als Quantenstrahlung bezeichnet, zählen Elektronen und Photonenstrahlung ( $\gamma$ - und Röntgenstrahlung), welche die Atome der Zielmaterie in Abhängigkeit der Energie über den Photo- oder Comptoneffekt oder die Paarbildung ionisieren. Die Energie wird auf Elektronen der Zielmaterie übertragen, wobei die räumliche Verteilung der Energiedeposition stochastisch verteilt ist (Abbildung 1.1).

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.1:** Unterschiedliche Energiedeposition von Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen bei einer Bestrahlung mit jeweils 2 Gy auf einer Fläche entsprechend der eines Fibroblastenzellkerns. Bei einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wird die Dosis homogen über die Fläche verteilt. Die Energiedeposition bei Ionenbestrahlung erfolgt entlang der Teilchenspur. Abbildung nach Scholz (Scholz 2003).

Freie Elektronen, die bei Ionisierungen erzeugt werden, bauen ihre Energie durch Interaktion mit anderen Elektronen der Zielmaterie ab und lösen bei hinreichender Energie weitere Ionisierungen aus. Die mittlere freie Weglänge zwischen diesen sekundären Ionisierungsereignissen sinkt mit der Energie der beteiligten Elektronen, was zur homogenen Verteilung der Ionisierungsereignisse führt. Durch die Absorption in der Materie nimmt die Energiedeposition von dünn-ionisierender Strahlung mit der Eindringtiefe exponentiell ab (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der Energiedeposition verschiedener Strahlenqualitäten in Abhängigkeit der Eindringtiefe in Wasser. Bei Photonenstrahlung nimmt die deponierte Dosis mit der Eindringtiefe exponentiell ab. Bei Kohlenstoff-Ionen steigt die Energiedeposition mit der Eindringtiefe an und fällt nach Erreichen der maximalen Eindringtiefe und Energiedeposition („Bragg-Maximum“) stark ab. Die Reichweite von Kohlenstoff-Ionen steigt mit ihrer Anfangsenergie.



## 1. Einleitung

### 1.1.2 Dicht-ionisierende Strahlung

Zur dicht-ionisierenden Strahlung zählen Neutronen, Protonen,  $\alpha$ -Teilchen und schwere Ionen. Der Energieverlust eines Ions entlang seiner definierten Wegstrecke durch die Zielmaterie wird als Linearer Energietransfer (LET) beschrieben und ist im Wesentlichen proportional zum Verhältnis aus dem Quadrat seiner effektiven Ladung und dem Quadrat seiner Energie ((Bloch 1933, Bethe 1930), Formel 1.2).

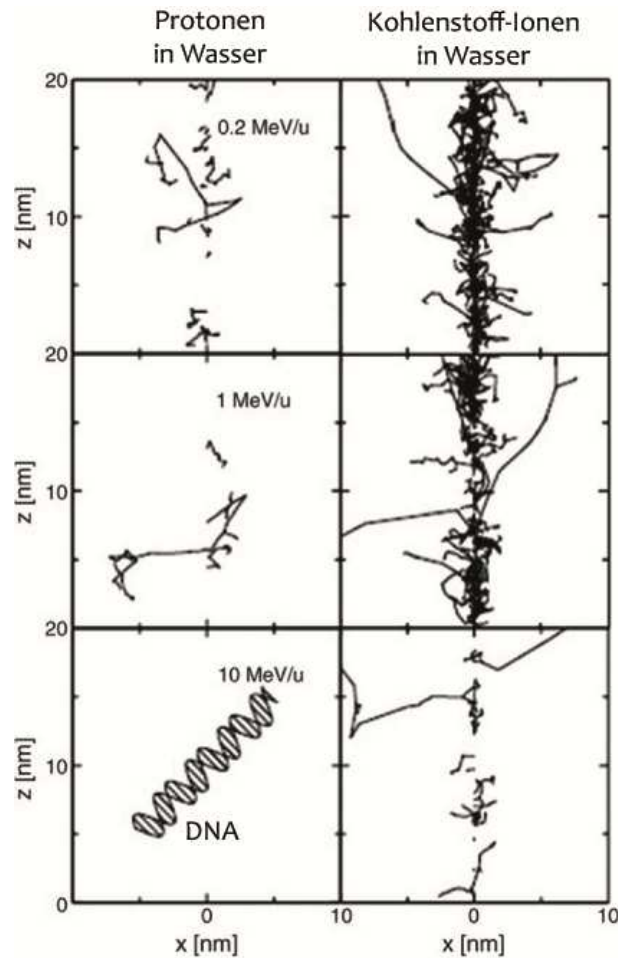
$$\text{LET} \left[ \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right] = \frac{\Delta E}{\Delta x} \propto \frac{Z_{\text{eff}}^2}{\beta^2} \quad (1.2)$$

LET	Linearer Energietransfer
$\Delta E$	Energieverlust
$\Delta x$	definierte Wegstrecke eines Ions
$Z_{\text{eff}}$	Effektive Ladung
$\beta$	$v/c$ (Teilchenenergie)

Der Energieverlust ist bei einer hohen Energie des Ions beim Durchdringen der Materie relativ gering, nimmt aber mit zunehmender Eindringtiefe und Energieverlust des Ions zu und erreicht ein Maximum kurz vor der maximalen Reichweite. Mit dem Erreichen sehr niedriger Energien nimmt das Ion mehr Elektronen aus der Materie auf. Dies reduziert die effektive Ladung und kompensiert den Anstieg des Energieverlustes am Ende der Teilchenspur. Die Kombination dieser beiden Effekte führt zu einem für das jeweilige Ion charakteristischen Tiefendosisprofil, das im Vergleich zu Photonenstrahlung invertiert ist (dargestellt in Abbildung 1.2). Auf eine im Verhältnis lange Wegstrecke mit relativ geringer Energiedeposition folgt eine kurze Strecke der Teilchenspur, auf der höhere Energiemengen in der Materie deponiert werden, dem sogenannten Bragg-Maximum. Hinter diesem fällt die Energiedeposition steil ab.

Die lokale Ionisationsdichte ist bei Ionen im Gegensatz zu Photonen sehr hoch und konzentriert sich um die Teilchenspur (Abbildung 1.3). Die Bildung von Sekundärelektronen ( $\delta$ -Elektronen) ist abhängig von der Ladung und Energie des Ions. Die Sekundärelektronen sind lateral um die Kernspur verteilt (Penumbra), wo sie zu weiteren Ionisierungsereignissen in der Materie führen.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.3:** Mikroskopischer Vergleich der Teilchenspuren von Protonen und Kohlenstoff-Ionen gleicher Energien vor und hinter dem Bragg-Maximum. Als Referenz ist schematisch ein DNA-Molekül gezeigt. Der Spurdurchmesser nimmt mit steigender Ordnungszahl und Energie zu und damit die Verteilung der Sekundärelektronen ( $\delta$ -Elektronen) um die Kernspur. Modifiziert nach Krämer und Kraft (Kramer und Kraft 1994).

Bei Bestrahlung von Zellen führt diese Dosisverteilung im Vergleich zur dünn-ionisierenden Strahlung zu lokal gehäuften und damit komplexeren Schäden („clustern“) im biologischen Ziel, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Kraft *et al.* 1992, Prise *et al.* 1994).

Die Durchgangsorte bei einer Ionenbestrahlung sind zufällig verteilt, was zu unterschiedlichen makroskopischen Profilen der Energiedeposition bei einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen führt (Abbildung 1.1). Ein wichtiger Parameter ist daher die Fluenz als Anzahl eingestrahelter Ionen pro Fläche, berechnet nach Formel 1.3. Die Dosis wird bei Bestrahlung mit Ionen daher durch die entsprechende Anzahl an Strahlpulsen appliziert. Die Anzahl der für eine bestimmte Dosis benötigten Pulse berechnet sich nach der Gleichung 1.4 und mit Gleichung 1.5 lässt sich die aus Fluenz und LET resultierende Dosis berechnen. Bei Bestrahlung von biologischen Proben wird näherungsweise die Dichte von Wasser verwendet ( $1 \text{ g/cm}^3$ ).

$$F\left[\frac{1}{\text{cm}^2}\right] = 0,625 \times 10^9 \times \frac{D[\text{Gy}] \times \rho\left[\frac{1}{\text{cm}^3}\right]}{\text{LET}\left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}}\right]} \quad (1.3)$$

## 1. Einleitung

$$N_p [Pulse] = \frac{F \left[ \frac{1}{cm^2} \right]}{K \left[ \frac{1}{Pulse \times cm^2} \right]} \quad (1.4)$$

$$D [Gy] = 1,6 \times 10^{-9} \times LET \left[ \frac{keV}{\mu m} \right] \times F \left[ \frac{1}{cm^2} \right] \times \frac{1}{\rho} \left[ \frac{1}{cm^3} \right] \quad (1.5)$$

D: Strahlendosis  
LET: linearer Energietransfer  
F: Teilchenfluenz  
 $\rho$ : Dichte des Strahlziels  
K: Kalibrierungsfaktor  
 $N_p$ : Anzahl der Pulse

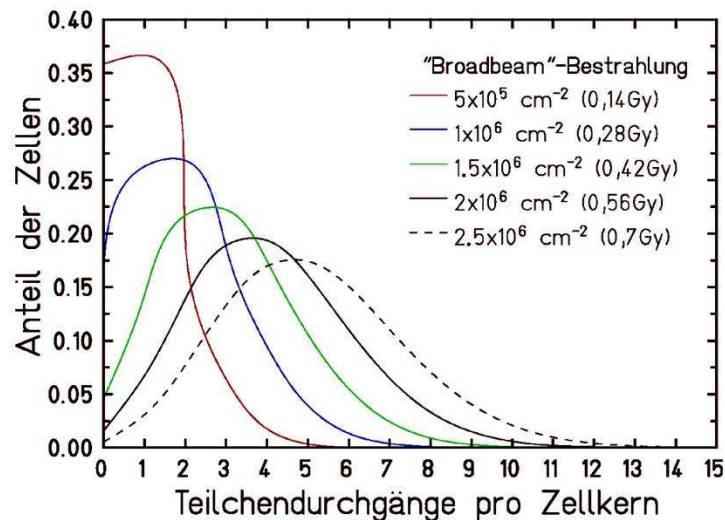
Die Anzahl von Ionendurchgängen pro Zellkern hängt ebenfalls von der Teilchenfluenz und der bestrahlten Fläche ab und berechnet sich nach der Poisson-Statistik (Formel 1.6).

$$p(n) = \frac{x^n \times e^{-x}}{n!} \quad (1.6)$$

p Wahrscheinlichkeit  
n exakte Trefferzahl  
x mittlere Trefferzahl

Durch diese stochastische Trefferverteilung werden bei Bestrahlung von biologischen Zielen die Zellkerne nicht gleich oft getroffen, wodurch die deponierte Dosis pro Zellkern variiert. Die statistische Trefferverteilung bei einer Bestrahlung mit im Mittel einem bis fünf Ionen-durchgängen pro Fibroblastenzellkern ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.4:** Poisson-Verteilung (Formel 1.6) der Anzahl an Teilchendurchgängen pro Fibroblastenzellkern ( $A_{\text{Zellkern}} = 226 \pm 93 \mu\text{m}^2$ , (Winter 2007)) in einer einlagigen konfluenten Zellschicht bei „broadbeam“-Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u; 170 keV/ $\mu\text{m}$ ] mit mittleren Teilchendurchgängen von einem bis fünf Ionen pro Zellkern. Teilchenfluenzen und Dosen wurden nach Formel 1.3 bzw. 1.6 berechnet.

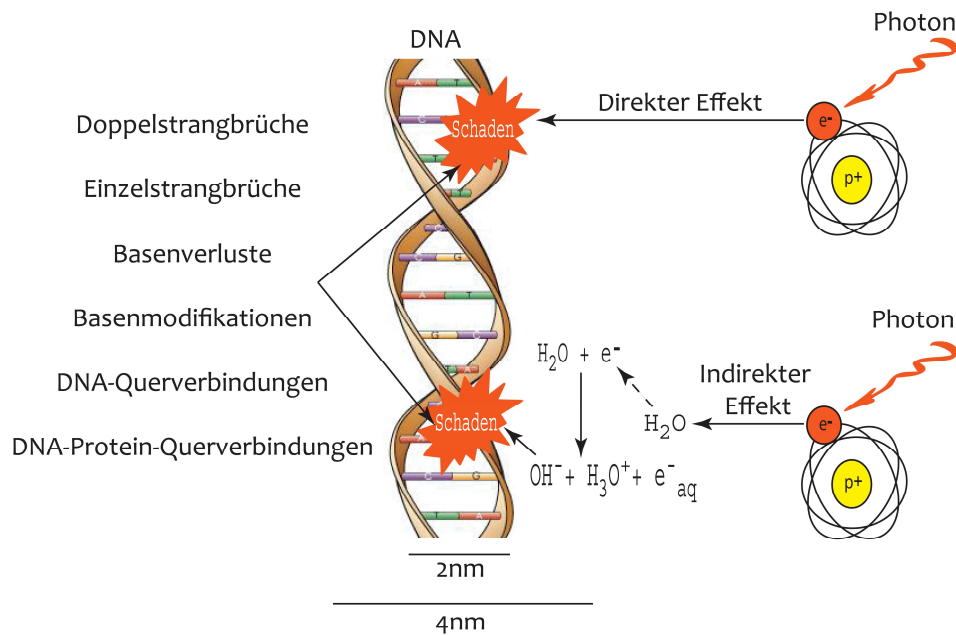
Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Arbeit, war diese stochastische Treffer- und damit Schadensverteilung der sogenannten „broadbeam“-Bestrahlungen, durch die gezielte Bestrahlung von Zellen mit einer definierten Anzahl einzelner Ionen an der Mikrosonde der GSI zu vermeiden. Eine detaillierte Beschreibung der Mikrosonde und Bestrahlungsmodalitäten findet sich in Abschnitt 2.2.4.

## 1.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

### 1.2.1 Schädigung der DNA

Das kritische Ziel bei einer Bestrahlung von Zellen stellt die DNA dar (Munro 1970). Dabei wird zwischen einem direkten oder indirekten Strahlenschaden unterschieden (Rajewsky 1952). Bei direkter Schädigung werden biologische Strukturen durch direkte Ionisierung ihrer Bindungselektronen zerstört. Da Zellen zu einem hohen Anteil aus Wasser bestehen, geht die hauptsächliche Schädigung der DNA allerdings auf die Radiolyseprodukte von Wasser zurück. Die dabei entstehenden Moleküle können in wässrigem Milieu über eine Distanz von 4 nm diffundieren (Übersicht in: (Hall und Giaccia 2006)). Die Wirkung ionisierender Strahlung auf das DNA-Molekül sowie die entstehenden Schäden sind in Abbildung 1.5 dargestellt.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.5:** Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung auf das DNA-Molekül. Bei direkter Schädigung erfolgt die Energieabsorption und Wirkung im gleichen Molekül. Beim indirekten Effekt erfolgt die biologische Wirkung intermolekular durch diffusible Radiolyseprodukte des Wassers, die einen maximalen Wirkungsradius von 4 nm aufweisen. Im DNA-Molekül auftretende Schäden sind Doppel- und Einzelstrangbrüche, Basenmodifikationen und -verluste, Bildung von Nukleotid-Dimeren oder DNA-DNA- sowie DNA-Protein-Querverbindungen. Modifiziert nach Hall (Hall und Giaccia 2006).

Die Wirkung dünn-ionisierender Strahlung geht zu 70 % auf indirekte Schäden zurück, während dicht-ionisierende Strahlung zu über 50 % direkt auf das biologische Ziel wirkt (Goodhead 1989). Die in sehr hoher Zahl erzeugten Basenschäden sowie Einzelstrangbrüche können, im Gegensatz zu den in niedrigerer Zahl entstehenden Doppelstrangbrüchen, leichter und fehlerfrei über Basenexzisionsreparatur oder Rekombinationsereignisse mit dem unveränderten homologen Strang (Homologe Rekombination) repariert werden. Doppelstrangbrüche, die über nicht-homologe-Endverknüpfung („Non-Homologous-End-Joining“, NHEJ) repariert werden, können zu interchromosomalen Austauschen oder Deletionen genetischen Materials führen und stellen damit den für die Zelle kritischeren Schaden dar (Iliakis *et al.* 2004).

Unabhängig von der Strahlenqualität werden in einer Zelle pro Gray 30-40 Doppelstrangbrüche erzeugt (Prise *et al.* 1998). Wie in Abbildung 1.3 dargestellt, führt die Bestrahlung mit dicht-ionisierender Strahlung zu einer sehr hohen lokalen Energiedeposition entlang der Teilchenspur, wodurch es dort zur vermehrten Bildung von Doppelstrangbrüchen kommt, die zu einer deutlicheren Beeinträchtigung der Reparierbarkeit und hoher Komplexität der resultierenden Verknüpfungen bzw. chromosomalen Aberrationen führt (Pastwa *et al.* 2003, Pinto *et al.* 2005, Prise *et al.* 2001). Bei Bestrahlung mit dünn-ionisierender Strahlung wird diese Komplexität der DNA-Schäden aufgrund der homogenen Verteilung der Dosis erst bei relativ hohen Dosen erreicht.

## 1. Einleitung

### Relative Biologische Wirksamkeit

Die biologische Wirkung ionisierender Strahlung wird neben dem LET von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Daher wurde als eine relative Bezugsgröße die sogenannte Relative Biologische Wirksamkeit (RBW) eingeführt, die sich aus dem Verhältnis der Dosen einer Referenzstrahlung (250 kV Röntgen- oder  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung) zur Teststrahlung berechnet, die zur Erzielung eines quantitativ gleichen Effektes führt (Formel 1.5).

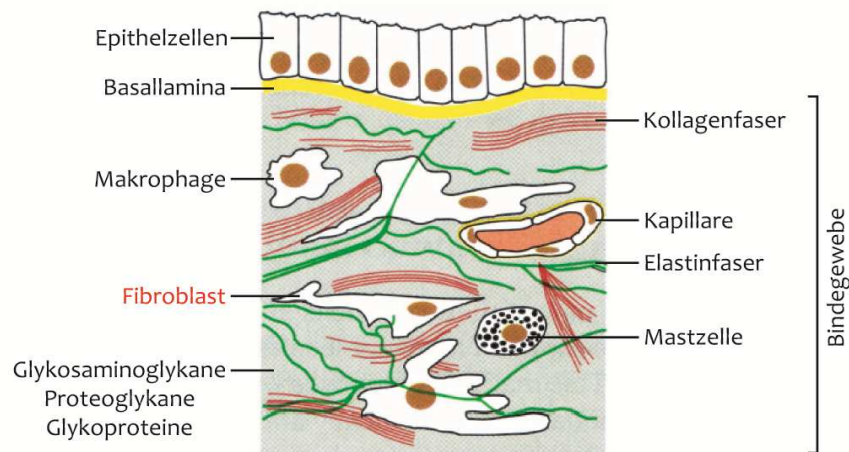
$$\text{RBW} = \frac{D_{\text{Referenzstrahlung}} [\text{Gy}]}{D_{\text{Teststrahlung}} [\text{Gy}]} \Bigg|_{\text{Isoeffekt}} \quad (1.7)$$

RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
$D_{\text{Referenzstrahlung}}$	Absorbierte Dosis der Referenzstrahlung (250 kV Röntgen- oder $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung)
$D_{\text{Teststrahlung}}$	Absorbierte Dosis der Teststrahlung

### 1.3 Fibroblasten als Modellsystem

Fibroblasten werden in der strahlenbiologischen Forschung häufig als ein Modellsystem benutzt, da sie bei einer externen Bestrahlung als Bestandteil des Bindegewebes immer betroffen sind. Das Bindegewebe setzt sich aus der extrazellulären Matrix (extracellular matrix, ECM) zusammen, deren Hauptbestandteile, wie Vorstufen des Kollagens oder Enzyme für deren Prozessierung, von Fibroblasten sekretiert werden und in der sie als Einzelzellen vorliegen (Abbildung 1.6).

## 1. Einleitung

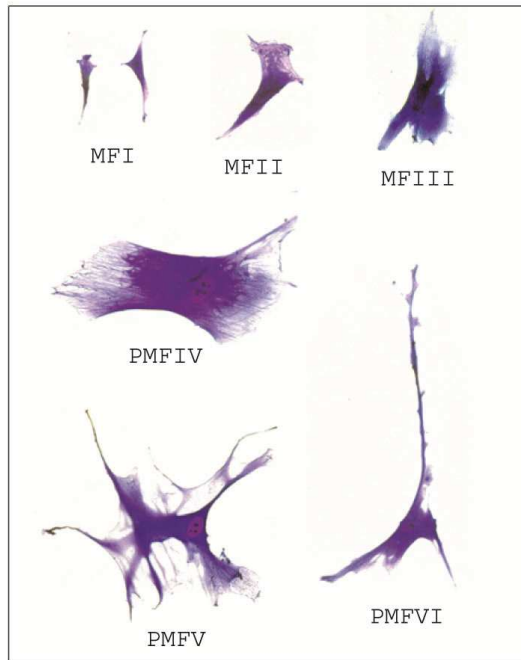


**Abbildung 1.6:** Schematischer Aufbau des Bindegewebes. Fibroblasten liegen als Einzelzellen in der extrazellulären Matrix vor, deren Hauptbestandteile wie Kollagenvorstufen von ihnen sekretiert werden. Modifiziert nach Alberts (Alberts 1994).

Das Bindegewebe ist in Muskeln, Sehnen, unter dem Epithel der Schleimhäute, um Nerven- und Gefäßbahnen und vor allem in der Haut zu finden, wo es am Aufbau der Dermis und Subkutis beteiligt ist. Das Bindegewebe hat neben einer hauptsächlich mechanischen Funktion die Aufgabe der Regulierung des Wasserhaushaltes, Stoffaustausches und der Wundheilung. Zusätzlich laufen Entzündungsreaktionen im Bindegewebe ab (Übersicht in (Alberts 1994)).

Normale humane Fibroblasten zeigen *in vitro* eine endliche replikative Lebensdauer. Ist das Ende der Teilungsaktivität erreicht, spricht man von replikativer Seneszenz, die einem irreversiblen Arrest der Zellen entspricht (Hayflick und Moorhead 1961). Aufgrund dieser Entwicklung werden Fibroblasten in Langzeitkulturen meist als Modellsystem der zellulären Alterung verwendet. Entgegen der *in vivo* Situation bilden Fibroblasten *in vitro* Zellverbände und teilen sich bei ausreichender Stimulierung durch mitogene Faktoren in Abhängigkeit ihres relativen zellulären Alters, bis eine dichteabhängige Kontaktinhibition einsetzt. Wird diese regelmäßig aufgelöst, nehmen die Zellen jeweils die Proliferation wieder auf, bis die replikative Seneszenz nach etwa 50 Populationsverdopplungen erreicht wird. Mit zunehmender Kultivierungsdauer und damit zellulärem Alter können Fibroblasten nach biochemischen und morphologischen Merkmalen unterschieden werden (Bayreuther *et al.* 1988). Letztere sind in Abbildung 1.7 dargestellt.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.7:** Morphologische Differenzierungsstadien von Fibroblasten und ihre Klassifizierung in mitotische (MFI-III) und postmitotische (PMFIV-VI) Stadien. Fotografien aus Fournier *et al.* (Fournier *et al.* 1998).

Dabei handelt es sich um eine Gruppe drei mitotisch aktiver Vorläuferzellen (MFI-III) sowie eine mit drei mitotisch inaktiven und ausdifferenzierten Fibrozyten (PMFI-III). Das letzte Stadium stellt das Ende der Lebensspanne dar, in der die Zellen degenerieren. Fibrozyten sind vor allem durch eine stark erhöhte Kapazität zur Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix, insbesondere Kollagen, gekennzeichnet (Rodemann und Muller 1991). Das Erreichen der terminalen Differenzierungsstadien von Fibroblasten wird bei *in vitro* Kultivierungen jedoch vom zeitlichen Abstand der Subkultivierungen, des Mediumwechsels und der Zelldichte sowie weiteren Faktoren, wie dem verwendeten Serum, beeinflusst (Winter 2007). Eine Bestrahlung von Fibroblasten kann den Differenzierungsprozess beschleunigen und damit das Gleichgewicht zwischen Fibroblasten und Fibrozyten zugunsten der Fibrozyten verschieben. Untersuchungen, die dieser Arbeit vorangingen, beschäftigten sich mit der Frage, welche Effekte nach Bestrahlung, insbesondere als Folge einer Strahlentherapie, in den betroffenen Zellen zu erwarten sind (Fournier *et al.* 2001, Fournier *et al.* 2007, Rodemann *et al.* 1991, Winter 2007). Dabei wurden vor allem die Zellzyklusregulierung, frühzeitige Seneszenz und Differenzierung sowie teilweise genomische Instabilität in humanen Fibroblasten untersucht, woran in dieser Arbeit angeknüpft wurde.

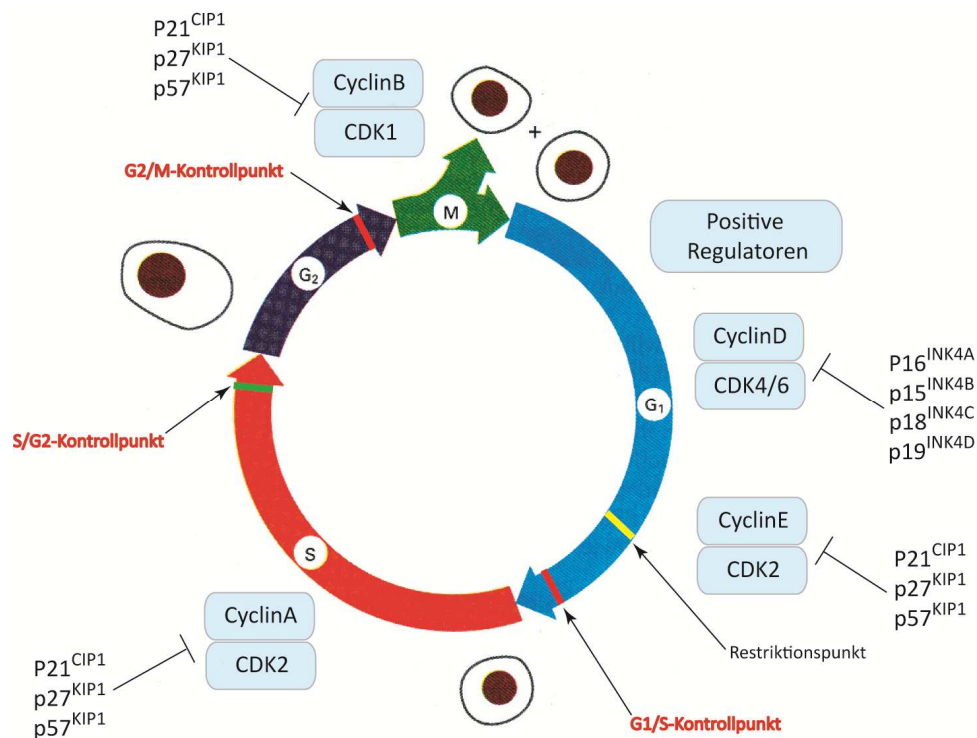
### 1.4 Inhibierung der Zellzyklusprogression

Alle lebenden Organismen sichern durch Zellteilungen ihr Überleben und ihren Fortbestand. Die Zellen durchlaufen dabei verschiedene Phasen, die zwischen zwei Teilungen einer Zelle als Zellzyklus bezeichnet werden. Die Teilung einer Zelle unterliegt einer strikten Zellzyklus-



## 1. Einleitung

kontrolle. Ein Fortschreiten wird an den Kontrollpunkten positiv von Proteinkinasen (cycline dependent kinases, CDKs), welche durch Cykline aktiviert werden, reguliert (Abbildung 1.8). Die Cykline, deren Konzentrationen sich in der Zelle periodisch ändern, sind daher die regulatorische Untereinheit für die enzymatisch aktiven Proteinkinasen. Die verschiedenen Cyclin-CDK-Komplexe lösen im Zellzyklus unterschiedliche Schritte aus (Übersicht in (Alberts 1994, Sherr 1996)).



**Abbildung 1.8:** Zellzyklus der eukaryontischen Zelle. Auf die G<sub>1</sub>-Phase, in der die Vorbereitung auf die DNA-Replikation stattfindet, folgt diese in der S-Phase. In der G<sub>2</sub>-Phase erfolgt die Vorbereitung auf die Zellteilung (Mitose). Verschiedene Cykline und CDKs werden periodisch während des Zellzyklus exprimiert und stimulieren die Progression in die unterschiedlichen Phasen. Die Aktivität der CDKs kann an Kontrollpunkten der jeweiligen Zellzyklusphasen durch CDK-Inhibitoren gehemmt werden und führt zu Zellzyklusarresten. Modifiziert nach Alberts (Alberts 1994).

Der Zellzyklusarrest in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus erfolgt in Fibroblasten hauptsächlich über eine Inhibierung der Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb), dass in diesem Zustand die Freisetzung des Transkriptionsfaktor E2F verhindert und damit dessen Transkriptionsaktivität inhibiert. Die Transkriptionsaktivität von E2F ist für Cykline und CDKs, die einen Übergang von der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase des Zellzyklus regulieren, notwendig. Die Hypophosphorylierung von Rb wird in proliferationsaktiven Zellen durch die spezifische Inhibierung von CDKs erreicht. In der vorliegenden Arbeit wurden die CDK-Inhibitoren p21, p27 und p16 untersucht und werden im Folgenden Zusammen mit den ebenfalls untersuchten zellzyklusrelevanten Proteinen p53 und PCNA kurz beschrieben.

## 1. Einleitung

Das Tumorsuppressorprotein **p53** besitzt nur eine geringe zelluläre Halbwertszeit, da es einer kontinuierlichen proteolytischen Degradierung unterliegt. Es wird durch ionisierende Strahlung, oxidativen Stress oder ähnliche Einwirkungen über die entstehenden DNA-Schäden und daraus resultierende Kaskaden von Proteininteraktionen stabilisiert und akkumuliert im Zellkern (Appella und Anderson 2001). Eine Aktivierung von p53 führt durch die Transaktivierung zahlreicher Zielgene zu einem transienten oder permanenten Zellzyklusarrest oder Apoptose (Sax und El-Deiry 2003). Hinsichtlich der Inhibierung der Zellzyklusprogression ist dabei vor allem die Aktivierung des Gens des CDK-Inhibitors p21 von Interesse (El-Deiry *et al.* 1993).

**p21** inhibiert hauptsächlich die Kinaseaktivität des CDK2/Cyclin E-Komplexes (Xiong *et al.* 1993). Die p21-Expression kann über eine Vielzahl von Faktoren induziert werden (Gartel und Tyner 1999) aber die transkriptionelle Aktivierung als Antwort auf DNA-Schäden erfolgt hauptsächlich durch p53 (El-Deiry *et al.* 1993).

**p16** inhibiert die Kinaseaktivität der CDK4,6/Cyclin D-Komplexe (Serrano *et al.* 1993). Die Expression von p16 kann durch suboptimale Kultivierungsbedingungen (Ramirez *et al.* 2001), Dysfunktion von Telomeren (Takai *et al.* 2003) oder DNA-schädigende Agentien (Suzuki *et al.* 2001, Robles und Adami 1998) ausgelöst werden und führt zum Zellzyklusarrest (Alcorta *et al.* 1996, Hara *et al.* 1996). Über die p16 aktivierenden Signalwege ist allerdings wenig bekannt (Kim und Sharpless 2006).

Die Transaktivierung von **p27** ist nicht von p53 abhängig und erfolgt über PI3K-Antagonisten (Collado *et al.* 2000). Der CDK-Inhibitor p27 verhindert durch Inhibierung der Kinaseaktivität der CDK2/Cyclin A- und E-Komplexe ebenfalls einen Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Polyak *et al.* 1994). Fibroblasten zeigen einen Anstieg zellulärer Mengen von p27 in Abhängigkeit der Zelldichte (Coats *et al.* 1996), bei längerem Serumentzug (Sherr und Roberts 1999) und mit Erreichen der replikativen Seneszenz (Wagner *et al.* 2001).

Der in dieser Arbeit untersuchte Replikations-Kofaktor **PCNA** ist ein essentieller Faktor der für die DNA-Replikation und -Reparatur verantwortlichen DNA-Polymerasen  $\epsilon$  und  $\delta$  (Waga *et al.* 1994, Prives und Gottifredi 2008) und wurde daher als ein Indikator der Teilungsaktivität von Fibroblasten herangezogen.

### 1.4.1 Inhibierung der Zellzyklusprogression nach Bestrahlung

Nach einer DNA-Schädigung durch Bestrahlung kann es zu einer Verzögerung des Zellzyklus in der G1-, S oder G2-Phase kommen, die durch den Tumorsuppressor p53 vermittelt wird (Di Leonardo *et al.* 1994, Gadbois *et al.* 1996). Dieser Arrest kann transient oder permanent sein. Ein transienter Arrest dauert meist mehrere Tage an und erlaubt die Reparatur der entstandenen DNA-Schäden und einen Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus

## 1. Einleitung

(Little 1994). Die Länge des Arrestes und die relativen zellulären Mengen der dafür verantwortlichen zellzyklusinhibierenden Proteine (p53, p21, p16) zeigen eine Abhängigkeit von der Strahlenqualität sowie der applizierten Dosis (Nasonova *et al.* 2004, Fournier *et al.* 2007, Scholz *et al.* 1994). Bleiben die Zellen dauerhaft arretiert oder sterben, sind die entstandenen Schäden zu komplex und irreparabel (Bartek und Lukas 2001). Damit wird deren Weitergabe an die Nachkommen bestrahlter Zellen verhindert.

### 1.5 Alterung und Seneszenz von Fibroblasten

Normale humane somatische Zellen zeigen eine begrenzte Teilungsaktivität und damit replikative Lebensspanne, die als Seneszenz bezeichnet wird (Hayflick und Moorhead 1961). Diese entspricht einem irreversiblen Zellzyklusarrest der Zellen. Ausnahmen stellen Stammzellen und Zellen der Keimbahn dar, die dadurch eine Regeneration und den Funktionserhalt von Geweben gewährleisten (Toen 2003).

Der Eintritt in die Seneszenz wird hauptsächlich auf die Akkumulation von DNA-Schäden zurückgeführt, wodurch die Proliferation geschädigter Zellen mit Mutationen von Genen, die potentiell zur neoplastischen Transformation beitragen können, verhindert wird. Dazu zählen vor allem Proto-Onkogene wie Rb oder das Tumorsuppressorprotein p53, deren Inaktivierung zu einer verlängerten replikativen Lebensspanne der Zellen führt, was einem ersten Schritt in die Richtung der neoplastischen Transformation darstellt (Wei *et al.* 2003, Shay *et al.* 1991). Die Seneszenz stellt mit dieser Begrenzung der mitotischen Aktivität geschädigter Zellen einen evolutionären und essentiellen Tumorsuppressormechanismus dar (Campisi 2001, Wright und Shay 2001, Dimri 2005).

Seneszenz wird einerseits replikativ durch fortschreitende Teilungsaktivität und Differenzierung oder andererseits in proliferationsaktiven Zellen durch eine akute Einwirkung extrinsischer Stressfaktoren ausgelöst.

#### Replikative Seneszenz von Fibroblasten

Als eine der ersten beschriebenen Ursachen für den Eintritt in die replikative Seneszenz gilt die sukzessive replikative Verkürzung der Chromosomenenden, der Telomere (Harley *et al.* 1990, Olovnikov 1973, Watson 1972). Diese bestehen aus repetitiven, nicht-kodierenden Sequenzen ((TTAGGG)<sub>n</sub>) mit einer in humanen Zellen maximalen Länge von bis zu 15 Mb, die am distalen Ende einen etwa 150 bp langen 3'-Einzelstrangüberhang aufweisen. Dieser bildet mit einem Komplex aus 6 Proteinen (Pot1, TRF1, TRF2, Tin2, TPP1, Rap1), dem sogenannten „Shelterin“, die schützende Struktur der T-Schleife („telomeric loop“, (Blackburn 2001, de Lange 2005)). Dadurch werden die linearen Chromosomenenden nicht als DNA-

## 1. Einleitung

Schaden erkannt und prozessiert (Vaziri und Benchimol 1996). Die Telomersequenzen werden aber bei jeder Zellteilung aufgrund einer fehlerhaften DNA-Replikation (Olovnikov 1973, Watson 1972), dem sogenannten „End-Replikations-Problem“, um etwa 50-150 bp verkürzt (Huffman *et al.* 2000). Wird eine kritische Länge der Telomersequenzen von unter 3 kbp erreicht (Allsopp und Harley 1995), kommt es zum Verlust der schützenden Proteinstrukturen, wodurch freie DNA-Enden vorliegen. Diese lösen eine DNA-Schadensantwort und damit die Seneszenz, hauptsächlich über die p53-vermittelte Signalkaskade, aus (Smogorzewska und de Lange 2002). Daher werden die Telomere und deren sukzessive, replikative Verkürzung als sogenanntes „Zählwerk“ oder „mitotische Uhr“ der Zelle bezeichnet. Die Aktivität der reversen Transkriptase Telomerase kann durch die Synthese von Telomersequenzen an den Chromosomenenden dieser Verkürzung entgegenwirken (Greider und Blackburn 1985). Sie ist jedoch nur in Zellen der Keimbahn oder Tumorzellen und sehr selten in somatischen Zellen aktiv (Greider 1994).

### **Stress-induzierte Seneszenz**

Die stress-induzierte Seneszenz wird durch Einwirkung extrinsischer Faktoren ausgelöst. Dazu zählen die Überexpression von Onkogenen wie Raf oder Ras (Ferbeyre *et al.* 2002, Lin *et al.* 1998, Dimri *et al.* 2002), Chromatindekondensation (Ogryzko *et al.* 1996) sowie die DNA-schädigende Wirkung ionisierender Strahlung (Robles und Adami 1998) oder klastogener Agentien (Robles und Adami 1998). Akuter oxidativer Stress, der durch hyperoxische Kultivierungsbedingungen (von Zglinicki *et al.* 1995, Balin *et al.* 1976) oder die Behandlung mit oxidativen Agentien (Chen und Ames 1994, Chen *et al.* 2001b) hervorgerufen wird, führt über DNA-Schäden ebenfalls zum frühzeitigen Einstellen der Teilungsaktivität.

Ob jedoch die replikative oder die stress-induzierte Seneszenz auf zwei unabhängige zelluläre Mechanismen zurückzuführen sind, ist Gegenstand andauernder Diskussion. Phänotypisch sind sich die hier unterschiedenen Typen der Seneszenz allerdings sehr ähnlich (Übersicht in (Toussaint *et al.* 2000b)). In vielen Arbeiten wird jedoch darauf hingewiesen, dass es sich bei der replikativen Seneszenz um einen Zellzyklusarrest handelt, der über die chronische Schädigung der DNA durch extrinsische Stressfaktoren der *in vitro* Kultivierung ausgelöst wird (Sherr und DePinho 2000, Cristofalo *et al.* 2004, Serrano und Blasco 2001, Ben-Porath und Weinberg 2004, Wright und Shay 2002). Eine zentrale Rolle kommt dabei vor allem dem umgebenden Sauerstoffpartialdruck zu, der bei *in vitro* Kultivierung unter atmosphärischen Sauerstoffbedingungen im Vergleich zu den Verhältnissen im entsprechenden Gewebe 15-150-fach erhöht ist, wodurch Zellen bei *in vitro* Kultivierungen chronischem oxidativem Stress ausgesetzt sind (Übersicht in (Halliwell 2003)). Dieser kann neben ge-

## 1. Einleitung

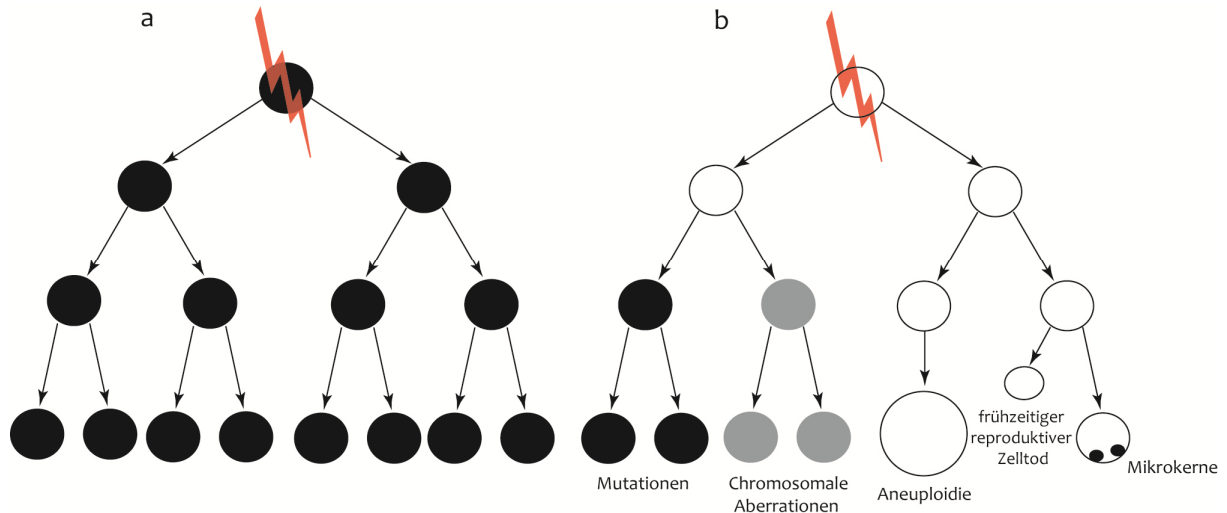
nomweiten DNA-Schäden vor allem zu einer beschleunigten Telomerverkürzung führen (von Zglinicki 2002, Houben *et al.* 2008). Die guanin-reichen Sequenzen der Telomere ((TTA $\text{GGG}$ )<sub>n</sub>) sind besonders von oxidativen Schäden betroffen (Oikawa und Kawanishi 1999, Neeley und Essigmann 2006). Hinzu kommt eine weniger effiziente Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen in der Telomerregion (Petersen *et al.* 1998). Dies führt zu beschleunigter Verkürzung und Dysfunktion von Telomeren. Eine rein von der Länge der Telomere abhängige Seneszenz konnte in diesem Zusammenhang in Fibroblasten meist nur bei Kultivierung unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen erreicht werden, während das Einstellen der Teilungsaktivität bei Kultivierung der Zellen unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen der stress-induzierten Seneszenz zugeschrieben wird (Wright und Shay 2002, Britt-Compton *et al.* 2009). Dennoch wird die rein vom End-Replikationsproblem der Telomere abhängige replikative Seneszenz als Obergrenze der Proliferationsaktivität somatischer Zellen angesehen (von Zglinicki 2003).

### 1.6 Strahleninduzierte genomische Instabilität und Tumorentstehung

Durch Strahlung verursachte DNA-Schäden stellen die Basis für die strahleninduzierte Karzinogenese dar. Dies ist ein mehrstufiger Prozess, der je nach Krebsart nach einer Latenzzeit von 15-20 Jahren nach der eigentlichen Strahlenexposition auftritt und in direktem Zusammenhang mit Mutationsereignissen steht, die als Konsequenz der Prozessierung des strahleninduzierten DNA-Schadens gesehen werden (Barcellos-Hoff und Nguyen 2009). Bestimmte, durch Strahlung induzierte, stabile chromosomale Aberrationen wie Translokationen, Insertionen oder Deletionen, die direkt an die Nachkommen einer Zelle weitergegeben werden, sind Teil des Prozesses der neoplastischen Transformation, die der Entstehung von Tumorzellen vorausgeht (Carrano *et al.* 1975, Elliott und Jasin 2002, Rabbitts 1994, Sharpless *et al.* 2001). In den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen konnten Generationen nach der eigentlichen Bestrahlung jedoch zusätzlich auch neu entstandene zelluläre Veränderungen nachgewiesen werden. Diese waren die Folgen genetischer Veränderungen und traten in Form von instabilen strukturellen und numerischen chromosomalen Aberrationen oder erhöhten Mutationsraten (z.B. Gen-Amplifikationen) und auf zellulärer Ebene durch Transformation oder frühzeitigen reproduktiven Zelltod auf. Dies wird als genomische Instabilität bezeichnet, die ebenfalls ein Charakteristikum von Tumorzellen und deren Entstehung darstellt (Übersicht in: (Heng *et al.* 2006a, Heng *et al.* 2006b)). Daher wird genomische Instabilität in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen als erster und kritischer Schritt der strahleninduzierten Karzinogenese diskutiert (Mothersill und Seymour 1998, Little 2000, Ullrich und Ponnaiya 1998). Während zuvor die Annahme galt, dass der strahleninduzierte zelluläre Schaden prozessiert, manifestiert und stabil an alle Nachkommen weitergegeben

## 1. Einleitung

wird, kam es nach den ersten Beobachtungen strahleninduzierter genomischer Instabilität zu einem Paradigmenwechsel in der strahlenbiologischen Forschung. Dieser ist schematisch in Abbildung 1.9 dargestellt.



**Abbildung 1.9:** (a) Konventionelles Paradigma der unveränderten und damit stabilen Weitergabe des prozessierten und manifestierten Strahlenschadens an alle Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zelle oder (b) Strahleninduzierte genomische Instabilität als verzögerter Effekt der Bestrahlung in den Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen. Diese kann unter anderem in Form von Mutationen, strukturellen oder numerischen Aberrationen, frühzeitigem reproduktivem Zelltod oder Mikrokernen auftreten. Modifiziert nach Morgan (Morgan 2003).

Genomische Instabilität wurde zuerst von Weissenborn und Streffer (Weissenborn und Streffer 1988) sowie Pampfer und Streffer (Pampfer und Streffer 1989) in Biopsien der Haut von Föten der Maus, die zuvor im Einzellstadium der Zygote mit Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, als eine Zunahme *de novo* gebildeter instabiler chromosomaler Aberrationen beschrieben. Dies wurde gefolgt von diversen Arbeiten, die genomische Instabilität in unterschiedlichen zellulären Modellsystemen nach Bestrahlung mit dünn- oder dicht-ionisierender Strahlung zeigen konnten (Übersicht in: (Smith *et al.* 2003)). Strahleninduzierte genomische Instabilität konnte *in vitro* bereits in den Nachkommen bestrahlter Zellen aus unterschiedlichen Geweben der Maus (Ponnaiya *et al.* 1997b, Kadhim *et al.* 1994, Kadhim *et al.* 1992), Mensch-Hamster-Hybrid-Zellen (Marder und Morgan 1993) und verschiedenen humanen Zelltypen wie Fibroblasten, Epithelzellen oder Lymphoblastoiden Zellen (Zahnreich *et al.* 2010, Fournier *et al.* 2007, Durante *et al.* 1996, Grososky *et al.* 1996, Martins *et al.* 1993, Kadhim *et al.* 1994, Kadhim *et al.* 1998, Sudo *et al.* 2008, Ponnaiya *et al.* 1997a) gezeigt werden. *In vivo* wurde strahleninduzierte genomische Instabilität ebenfalls in weiteren Studien in hämatopoetischen Zellen bestrahlter Mäuse (Watson *et al.* 1996, Ullrich und Davis 1999), bestrahlter Tumorpatienten (Hille *et al.* 2010, Vinnikov *et al.* 2010) oder in Unfällen strahlenexponierten Personen (Salomaa *et al.* 1998) beobachtet. Es liegen allerdings auch Arbeiten vor, in denen *in vitro* wie auch *in vivo* keine erhöhte Rate chromosomaler Aberrationen in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen bzw. Zellen strahlenexponierter In-

## 1. Einleitung

dividuen festgestellt wurde (Bouffler *et al.* 2001, Dugan und Bedford 2003, Tawn *et al.* 2005, Vinnikov *et al.* 2010, Whitehouse und Tawn 2001). Des Weiteren wurden Unterschiede im Auftreten genomischer Instabilität in Nachkommen bestrahlter humaner Fibroblasten oder Knochenmarkszellen zwischen verschiedenen Spendern in Arbeiten von Kadhim *et al.* (Kadhim *et al.* 1998, Kadhim *et al.* 1994) beobachtet. Diese Unterschiede wurden unter anderem auf eine genetische Prädisposition einzelner Spender für eine strahleninduzierte genomische Instabilität zurückgeführt (Kadhim 2003), wie sie für viele biologische Endpunkte bezüglich der Späteffekte einer Strahlenexposition diskutiert wird (Borgmann *et al.* 2008, Borgmann *et al.* 2002).

Auch wenn eine Vielzahl der zellulären Veränderungen und Endpunkte, die mit der strahleninduzierten genomischen Instabilität in Verbindung stehen, sehr detailliert charakterisiert sind, sind die zugrundeliegenden molekularen und biochemischen Wirkungsmechanismen bisher noch offen. Als Ursachen werden unter anderem eine fehlerhafte Reparatur der durch Strahlung erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche, sekundäre DNA-Schäden durch oxidativen Stress, dysfunktionale Telomerstrukturen oder epigenetische Mechanismen diskutiert (Suzuki *et al.* 2003, Limoli *et al.* 1997, Kim *et al.* 2006, Wright 2010). Viele der genannten Faktoren können aber auch die zelluläre Seneszenz auslösen, wodurch die Zellen aus der Gemeinschaft proliferierender Zellen eliminiert werden und keinen direkten Beitrag mehr zur Tumorentstehung leisten. Einige der oben genannten Veränderungen könnten in den Nachkommen bestrahlter Zellen auftreten und damit potentiell zu einer Deregulierung von Mechanismen der Zellzyklusregulierung und DNA-Reparatur führen, die für eine Gewährleistung der Integrität des Genoms verantwortlich sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich daher mit der Frage, ob das Auftreten einer strahleninduzierten genomischen Instabilität in Verbindung zu einigen dieser möglichen Abhängigkeiten, wie der stabilen Vererbung strahleninduzierter chromosomaler Aberrationen und damit genetischen Veränderungen, oxidativem Stress oder einer veränderten Zellzyklusregulierung in den Nachkommen bestrahlter Zellen steht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Kultivierungsbedingungen berücksichtigt, indem die Nachkommen bestrahlter Zellen einerseits in Massenkulturen und andererseits in Kolonien, die aus einzelnen bestrahlten Zellen hervorgegangen sind, untersucht wurden. Normale humane Fibroblasten wurden dabei als Modellsystem gewählt, da sie von der Vielzahl der verwendeten Zellsysteme als primäre humane Zellen einen unveränderten Zelltyp darstellen. Immortale oder tumorähnliche Zelllinien können bereits eine Prädisposition für eine strahleninduzierte Karzinogenese und damit genomische Instabilität aufweisen, deren Entstehung dadurch begünstigt wird.

### 1.7 Oxidativer Stress und Reaktive Sauerstoffspezies

Chronischer oxidativer Stress steht in direktem Zusammenhang mit frühzeitiger replikativer Seneszenz (Chen und Ames 1994, Tulard *et al.* 2003) sowie genomischer Instabilität von Zellen (Clutton *et al.* 1996, Limoli *et al.* 2003, Tominaga *et al.* 2004), die beide als Späteeffekte einer Strahlenexposition in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Fibroblasten beobachtet wurden (Zahnreich *et al.* 2010, Fournier *et al.* 2007). Ebenso liegen Hinweise auf oxidativen Stress in direkt bestrahlten Fibroblasten (Rugo *et al.* 2002, Colindres 2008) aber auch dessen Persistenz bzw. einen Wiederanstieg in Nachkommen bestrahlter Zellen vor (Rugo und Schiestl 2004). Daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Untersuchung einer direkten Induktion von oxidativem Stress durch Bestrahlung von Fibroblasten, sowie der Langzeitentwicklung nicht bestrahlter und den Nachkommen bestrahlter Fibroblasten, im Zusammenhang mit frühzeitiger replikativer Seneszenz und genomischer Instabilität.

Die schädigende Wirkung von Sauerstoff geht nicht nur von molekularem Sauerstoff selbst aus, sondern auch von den Nebenprodukten der oxidativen Energiegewinnung, den reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS). Diese werden durch zytosolische, aber hauptsächlich Proteine der mitochondrialen Elektronentransportkette gebildet (Übersicht in: (Valko *et al.* 2007, Turrens 2003)). Zu den wichtigsten ROS zählen das Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid und das Hydroxyl-Radikal. Oxidativer Stress beschreibt in diesem Zusammenhang den Verlust der zellulären Redox-Homöostase, d.h. der Erhaltung des Gleichgewichtes der ROS-Erzeugung sowie deren Neutralisierung durch antioxidative Schutzmechanismen. Chronischer oxidativer Stress stellt den dauerhaften Verlust des Gleichgewichtes zugunsten der ROS-Erzeugung dar (Droege 2002).

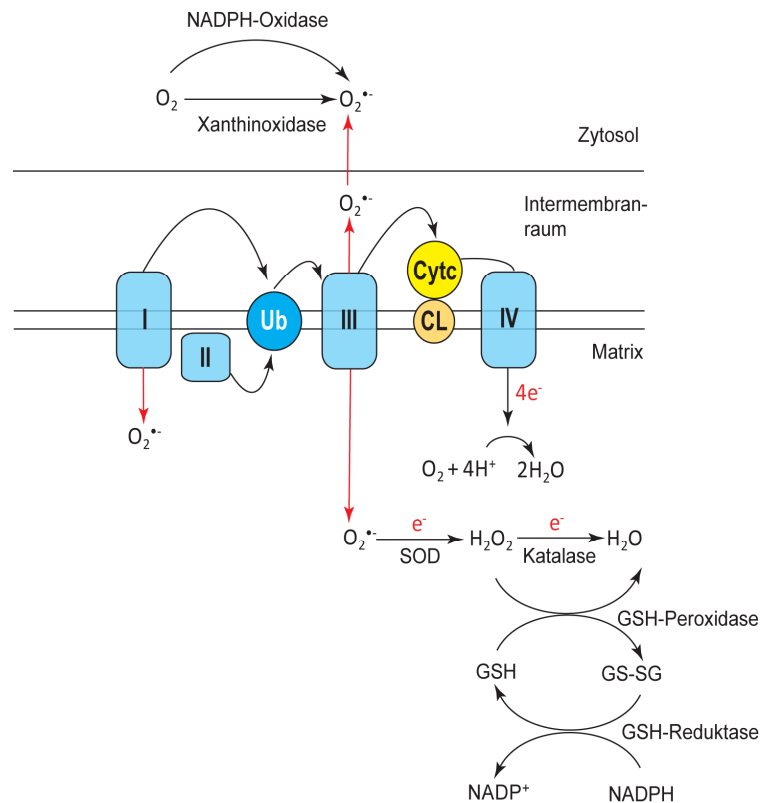
Der kritischste oxidative zelluläre Schaden ist die Oxidation der DNA, d.h. von Basen sowie der Desoxyribose (Halliwell und Gutteridge 2007). ROS kommt allerdings auch eine duale Rolle zu. Neben ihrer schädigenden Wirkung stellen sie in niedriger Konzentration ebenso wichtige Faktoren, z.B. der Wachstumsfaktor- oder Zytokin-vermittelten rezeptorabhängigen Signaltransduktion dar (Übersicht in: (Finkel 1998, Lander 1997)).

#### Physiologische ROS-Erzeugung und Neutralisierung

In zellulären Systemen stellen Sauerstoffradikale und deren Derivate die größte und wichtigste Klasse reaktiver Verbindungen dar. Das Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) ist ein zentrales und primäres Radikal, dass durch die Addition eines Elektrons an molekularen Sauerstoff entsteht. Die physiologische Erzeugung des Superoxid-Anions findet hauptsächlich in der Elektronentransportkette der Mitochondrien (Komplex I und III, Semi-Ubichinon) sowie im Zytosol über die NAD(P)H- und Xanthinoxidase statt (Abbildung 1.10).



## 1. Einleitung



**Abbildung 1.10:** Zusammenfassung der physiologischen ROS-Erzeugung sowie deren Neutralisierung. Das Superoxid-Anion wird durch die Komplexe I (Ubichinon–Oxidoreduktase/NADH-Dehydrogenase) und II (Ubihydrochinon/Cytochrom c-Oxidoreduktase) der Elektronen-transportkette der Mitochondrien gebildet und teilweise freigesetzt. Im Zytosol wird das Superoxid-Anion durch die NAD(P)H-Oxidase sowie die Xanthinoxidase gebildet. Ein enzymatischer ROS-Abbau erfolgt über die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Glutathion-Peroxidase /Reduktase. Modifiziert nach Orrenius *et al.* (Orrenius *et al.* 2007) und Dröge (Droege 2002). (Ub Ubichinon, CL Cardiolipin, Cyt c Cytochrom c).

Unter *in vitro* Bedingungen werden 1-3 % der in isolierten Mitochondrien gebildeten Superoxid-Anionen freigesetzt (Boveris und Chance 1973), wobei jedoch etwa 50 % dieser Superoxid-Anionen die Matrix der Mitochondrien nicht verlassen. Durch direkte molekulare Interaktionen und Enzym- oder Metall-katalysierte Prozesse werden aus dem Superoxid-Anion eine Vielzahl sekundäre ROS erzeugt. Darunter ist das Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\bullet}$ ) das reaktivste mit einer allerdings nur sehr kurzen Lebensdauer von  $10^{-9}$  Sekunden und damit einem begrenzten Wirkungsradius. Ein weiteres starkes Oxidationsmittel ist das nicht radikalische Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das intrazellulär in Peroxisomen (Valko *et al.* 2004) oder über die Oxidation von Superoxid-Anionen mittels der Superoxid-Dismutase produziert wird (Abbildung 1.10). Erhöhte Freisetzungsraten von ROS werden auf mitochondriale Dysfunktionen zurückgeführt, die im Zusammenhang mit Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) diskutiert werden. Diese nehmen mit der zellulären Alterung zu (Laderman *et al.* 1996, Doggett *et al.* 1992, Gerhard *et al.* 2002) und können durch die direkte Einwirkung ionisierender Strahlung erzeugt werden (Prithivirajasingh *et al.* 2004).

## 1. Einleitung

Die Erhaltung der zellulären Redox-Homöostase und damit der normalen zellulären Funktionen erforderte die evolutionäre Entwicklung von Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress (Cadenas 1997). Dazu zählen präventive Mechanismen, Reparaturmechanismen sowie physische und antioxidative Schutzmechanismen. Antioxidativ wirkende Enzyme sind die Superoxid-Dismutase, Katalase und Gluthation-Peroxidase. Die Wirkungsmechanismen dieser Enzyme sind beispielhaft in Abbildung 1.10 zusammengefasst. Nicht-enzymatische molekulare Substanzen, die zur Erhaltung des Redox-Gleichgewichtes beitragen, sind Ascorbinsäure (Vitamin C),  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Karotinoide und andere.

### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur realistischen Bewertung des genetischen Risikos von dicht-ionisierender Strahlung zu leisten. Dies hat große Bedeutung im Rahmen der vermehrten Anwendung von schweren Ionen in der Tumorthherapie sowie für den Strahlenschutz. Dazu sollten zytogenetische Veränderungen in humanen Fibroblasten über einen längeren Zeitraum nach Bestrahlung untersucht werden. Im Gegensatz zu den häufig für genetische Risiken untersuchten Zellen des hämatopoetischen Systems reagieren Fibroblasten auf Bestrahlung nicht mit der Einleitung des Zelltods. Ionisierende Strahlung induziert in Fibroblasten vielmehr in Abhängigkeit vom Umfang und der Komplexität des entstandenen DNA-Schadens eine verfrühte Weiterentwicklung in terminale Differenzierungsstadien und Seneszenz. Beides trägt zur genomischen Stabilität dieses Zelltyps bei. Sofort nach Bestrahlung kommt es zu einer Inhibierung der Zellzyklusprogression. Diese ist häufig irreversibel, kann allerdings auch transient sein, d.h. die Zellen nehmen die Teilungsaktivität Tage oder sogar Wochen nach Bestrahlung wieder auf.

Es ist bereits bekannt, dass im Vergleich zu dünn-ionisierender Strahlung dicht-ionisierende Strahlenqualitäten mehr und auch komplexere Schäden in der DNA von Zellen erzeugen, deren Reparatur erschwert ist. Die nachfolgenden zellulären Reaktionen in direkt bestrahlten Zellen sind entsprechend ausgeprägter. Beim Vergleich von physikalischen Dosen, die in direkt bestrahlten Zellen ähnliche Effekte hervorrufen, hat sich in Vorarbeiten allerdings herausgestellt, dass genomische Instabilität vor allem in den Nachkommen von mit hohen Röntgendosen bestrahlten Zellen auftrat und zu einem deutlich geringeren Maße nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen.

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit unter Einbeziehung von Differenzierung, Seneszenz und dem Redoxstatus in Zellen direkt nach Bestrahlung untersucht werden, warum genetische Instabilität als Folge von Bestrahlung mit dicht-ionisierenden Kohlenstoff-Ionen weniger deutlich auftritt. Um in den Nachkommen bestrahlter Zellen mögliche zellspezifische Entwicklungen von den strahlenbedingten unterscheiden zu können, wurde zuerst ermittelt,

## 1. Einleitung

inwieweit sich verschiedene Fibroblastenlinien in ihrer zytogenetischen Entwicklung unterscheiden. Hierbei sollte insbesondere die Auswirkung der alterungsbedingten oder auch induzierten Kürzung der Chromosomenenden (Telomere) berücksichtigt werden. Die Auswirkungen dicht-ionisierender Bestrahlung wurde insbesondere bezüglich der Folgen von einzelnen Ionendurchgängen in den bestrahlten Zellen und deren Nachkommen durch Bestrahlung an der Mikrosonde der GSI untersucht.

## **2. Material und Methoden**

Für alle Experimente sind die benötigten Chemikalien, Lösungen, Medien, Antikörper, Nukleinsäuresonden, Verbrauchsmaterialien und Geräte im Anhang A näher aufgeführt:

- A.1 Chemikalien und Kits
- A.2 Lösungen und Puffer
- A.3 Medien und Seren für die Zellkultur
- A.4 Antikörper
- A.5 Nukleinsäuresonden
- A.6 Verbrauchsmaterialien
- A.7 Geräte und Software

Alle Untersuchungen wurden mit Chemikalien in p.a.-Qualität durchgeführt. Zum Ansetzen der Lösungen und Puffer wurde Wasser in Reinstqualität aus einer Umkehrosmose-Anlage (Millipore, Anhang A.7) verwendet.

### **2.1 Zellen und Kultivierungsmethoden**

#### **2.1.1 Verwendete Zellen**

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene, normale humane diploide Fibroblasten verwendet. Diese stammen aus den Ursprungsgeweben Vorhaut-, Haut- und Lunge und sind in Tabelle 2.1 näher spezifiziert. Es handelte sich dabei nicht um etablierte, immortale Linien, obwohl diese im Folgenden oft als Zelllinien bezeichnet werden.

## 2. Material und Methoden

**Tabelle 2.1:** In der vorliegenden Arbeit verwendete Fibroblasten, deren Bezeichnung, Ursprungsge-  
webe, PD bei Einsaat bzw. Versuchsbeginn und Herkunft im Überblick.

Zelllinie	Gewebe	Alter des Spenders	PD bei Versuchsbeginn	Herkunft
AG1522D	Vorhaut	Postnatal, 3 Tage	23-28	Coriell Institute of Medical Research Camden (NJ, USA)
NHDF	Haut	Postnatal, 10 Tage	9	Cell Systems (St. Katherine, BRD)
IMR-90	Lunge	Fötal, 16 Wochen	30-33	American Type Culture Collection (ATCC)
WI-38	Lunge	Fötal, 12 Wochen	36	American Type Culture Collection (ATCC)

### 2.1.2 Langzeitkultivierung und Lagerung der Zellen

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>) als Monolayer-Kulturen in Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Zellen erhielten ein Kompletmedium bestehend aus dem Vollmedium Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) mit Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS), 1 % Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Bei Kultivierung der Zellen in sehr niedrigen Zelldichten wurde Medium mit 15-20 % FCS für ein besseres Zellwachstum verwendet.

Da in der vorliegenden Arbeit unter anderem die Langzeitentwicklung von Fibroblasten untersucht wurden, erfolgte die Kultivierung der Zellen teilweise über einen Zeitraum von mehreren Monaten. Alle Zelllinien wurden dabei in regelmäßigen Abständen von 14 Tagen subkultiviert. Hierzu wurde das verbrauchte Medium dekantiert und die adhärenenten Fibroblasten mit 15 µl/cm<sup>2</sup> einer Trypsin/EDTA-Lösung (Anhang A.3) gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit 75 µl/cm<sup>2</sup> der Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C. Das Ablösen der Zellen wurde unter mikroskopischer Beobachtung kontrolliert. Durch Zugabe von mindestens der doppelten Menge an Medium mit Serum wurde nach dem Ablösen der Zellen das Trypsin durch Serumbestandteile inaktiviert. Mit einer 2 ml Glaspipette wurden durch Auf- und Abpipettieren noch bestehende Zellaggregate vereinzelt und die Zellzahl mittels eines elektronischen Zellzählgerätes (CASY, Schärfe System GmbH) bestimmt. Für Passagen wurde bei ausreichender Zellzahl standardmäßig die Neu-Aussaat von mehreren 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit einer Einsaatdichte von je 5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Fla-

## 2. Material und Methoden

sche durchgeführt. Für Langzeitexperimente wurden diese in 14-tägigem Abstand durchgeführt und ein Mediumwechsel fand alle 3-4 Tage statt.

Eine Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in Medium mit 20 % FCS und 10 % Glycerin bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Zu diesem Zweck wurden asynchrone Zellen trypsinisiert, gezählt und zentrifugiert (100 g, 8 min). Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen des Einfriermediums aufgenommen, um eine Zelldichte von  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml zu erhalten. Nach 20 min wurden die Zellen in 2 ml-Ampullen gefüllt und mittels einer Einfrierhilfe in Isopropanol bei -80°C über Nacht abgekühlt (1°C/min). Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgesetzt. Zwecks Wiedereinsaat wurden die Zellen nach Entgasung bei 37°C im Wasserbad erwärmt und in Kulturgefäße mit temperiertem Medium überführt. Nach Adhärenz der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um Rückstände des Einfriermediums zu entfernen.

### 2.1.3 Altersbestimmung von Fibroblasten

Da alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblasten nicht immortalisiert sind, unterliegen diese damit auch *in vitro* dem natürlichen Prozess der Alterung und Differenzierung (Bayreuther *et al.* 1991, Bayreuther *et al.* 1988). Der Differenzierungsgrad steigt dabei mit der Anzahl der absolvierten Populationsverdopplungen (PD). Die durchlaufenen PDs geben die Anzahl der Zellzahl-Verdopplungen innerhalb der Kulturdauer an und werden nach der Formel 2.1 berechnet:

$$PD = \sum \left[ \frac{\ln \frac{N}{N_0}}{\ln 2} \right] \quad (2.1)$$

N: Anzahl geernteter Zellen

$N_0$ : Anzahl eingesäter Zellen

## 2.2 Bestrahlungsexperimente

### Experimenteller Ablauf der Bestrahlungsexperimente

Für alle Bestrahlungsexperimente wurden die entsprechenden Zellen aus einer Stickstoff-Kryokonservierung aufgetaut (siehe Abschnitt 2.1.2). Die Zellen wurden bis zur ersten Passage mindestens 7 Tage kultiviert und anschließend die Aussaat in die entsprechenden Kultivierungsgefäße für die Bestrahlung vorgenommen. In allen Bestrahlungsexperimenten wur-

## 2. Material und Methoden

den als Kontrolle schein-bestrahlte Zellen mitgeführt, die bis auf die unterlassene Bestrahlung genau so behandelt wurden wie die bestrahlten Zellen.

### **2.2.1 Experimenteller Ablauf der Bestrahlungsexperimente für die Bestimmung intrazellulärer ROS-Mengen**

Für eine Bestrahlung von Zellen für eine anschließende Bestimmung der intrazellulären ROS-Mengen wurden asynchrone Populationen mit Röntgenstrahlung (2/6 Gy, siehe Abschnitt 2.2.3) sowie niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen (9,8 MeV/u; 0,5/2Gy, siehe Abschnitt 2.2.4) am „Universal Ion Linear Accelerator“ (UNILAC) sowie hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen (100 MeV/u; 0,5/2/6 Gy, siehe Abschnitt 2.2.4) am Schwerionensynchrotron (SIS) der GSI Darmstadt bestrahlt. Die Zellen wurden dafür 5 Tage vor der Bestrahlung mit einer Zelldichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in die für die jeweilige Bestrahlung notwendigen Kultivierungsgefäße ausgesät, wodurch sie zum Zeitpunkt der Bestrahlung asynchron vorlagen. Während des Transports der Zellen zur Bestrahlungsseinrichtung und während der Bestrahlung waren diese der Raumtemperatur für eine Dauer von etwa 30 min ausgesetzt. Der Transport der Zellen erfolgte in verschlossenen Behältern. Die durchflusszytometrischen ROS-Messungen (Abschnitt 2.3.2) wurden frühestens einen und in der Regel 3 Tage nach Bestrahlung und anschließend in 3-tägigem Abstand bis maximal 9 Tage nach der Bestrahlung durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung nicht subkultiviert und ein Mediumwechsel wurde alle 3 Tage vollzogen.

### **2.2.2 Experimentelle Abläufe der Bestrahlungsexperimente der Untersuchungen zur genomischen Stabilität in den Nachkommen bestrahlter Zellen**

Die Bestrahlung von Fibroblasten mit Röntgenstrahlung erfolgte als konfluente und damit in in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretierten Zellen. Diese wurden 7-10 Tage vor der Bestrahlung in einer Dichte von 6-10 x 10<sup>3</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit einer Einzeldosis von 2 Gy sowie einer Teildosis von 2 Gy, die in 8 täglichen Fraktionen appliziert wurde (8x2 Gy), bestrahlt. Die Bestrahlung mit der Einzeldosis von 2 Gy erfolgte parallel zur Applikation der letzten Fraktion der fraktionierten Dosis von 8x2 Gy. Aufgrund der Bestrahlungsmodalitäten der Mikrosonde (Abschnitt 2.2.4) konnten, um die zielgenaue Bestrahlung jeder Zelle zu gewährleisten, pro Bestrahlungsprobe jeweils nur maximal 500 Zellen bestrahlt werden. Da die Dauer der Bestrahlung und damit der Bestrahlungsradius möglichst gering zu halten war, wurden diese 500 Zellen in einem Volumen von 5-10 µl zentral in spezielle Bestrahlungskammern (siehe Abschnitt 2.2.4) eingesät. Nach dem Anheften der Zellen (4-6 h) wurde die Kammer vorsichtig zweimal mit jeweils 300 µl

## 2. Material und Methoden

Medium gewaschen, um tote oder nicht angeheftete Zellen zu entfernen. Die Kammer wurde anschließend mit 300 µl Medium gefüllt und bis zur Bestrahlung im Brutschrank inkubiert. Um ein Austrocknen des geringen Mediumvolumens zu verhindern, geschah dies in Kulturschalen ( $\varnothing = 9 \text{ cm}$ ) mit feuchter Atmosphäre. Aufgrund der niedrigen Einsaatdichte waren die Zellen asynchron und befanden sich nicht dauerhaft in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, in der die Bestrahlung stattfinden sollte. Daher mussten die Zellen spätestens 12 h nach der Einsaat bestrahlt werden, da in Versuchen durch Inkorporation halogener Nukleotide ab diesem Zeitpunkt eine Zellzyklusprogression festgestellt wurde. Die Bestrahlung der Zellen an der Mikrosonde erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

Für die Untersuchungen der genomischen Stabilität von Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder gezielter Bestrahlung mit einer definierten Anzahl von Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] an der Mikrosonde der GSI, wurden nach der Bestrahlung zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Die bestrahlten Zellen wurden dabei 24 h nach der Bestrahlung subkultiviert und als Kolonien klonogenen Ursprungs oder für die gezielte Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] zusätzlich in Massenkulturen aus 800-1000 bestrahlten Einzelzellen aus 2 Bestrahlungsproben weiterkultiviert.

### **Langzeitkultivierung bestrahlter Zellen in Kolonien**

Die mit Röntgenstrahlung in Massenkulturen bestrahlten Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, 24 h nach der Bestrahlung aus den Kulturgefäßen abgelöst, gezählt und anschließend analog zu den an der Mikrosonde mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen behandelt. Letztere wurden mit 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation für 5 min bei 37°C aus den Kammern abgelöst und in einem Mediumvolumen von 5 ml aufgenommen. Die Kammer wurde mit 300 µl Medium gespült um Zellverluste zu vermeiden. Aufgrund der niedrigen Zellzahl von maximal 500 Zellen pro Kammer, konnte die genaue Zellzahl nach dem Ablösen der Zellen nicht ermittelt werden. Es wurde daher die für jede Kammer während der Mikrosondenbestrahlung ermittelte Anzahl bestrahlter Objekte als Zellzahl der jeweiligen Kammer festgelegt. Diese lag, je nach Anheftungseffizienz, zwischen 400 und 500 Zellen pro Kammer.

Nach Bestrahlung wurden die Zellen für die spätere Isolierung der Kolonien mit einer Dichte von 2 Zellen/cm<sup>2</sup> in Kulturgefäße eingesät ( $\varnothing = 38 \text{ cm}^2$ ) und für 14 Tage kultiviert. Vor der Isolierung der Kolonien wurden die Kulturgefäße im Lichtmikroskop nach diesen abgesucht und an der entsprechenden Position einer Kolonie an der Unterseite markiert. Für die Isolierung wurden proliferationsaktive Kolonien mit hoher Zelldichte und mitotischen Differenzierungsstadien (MFII/II, Abschnitt 1.4) ausgewählt, um die für spätere Analysen erforderlichen



## 2. Material und Methoden

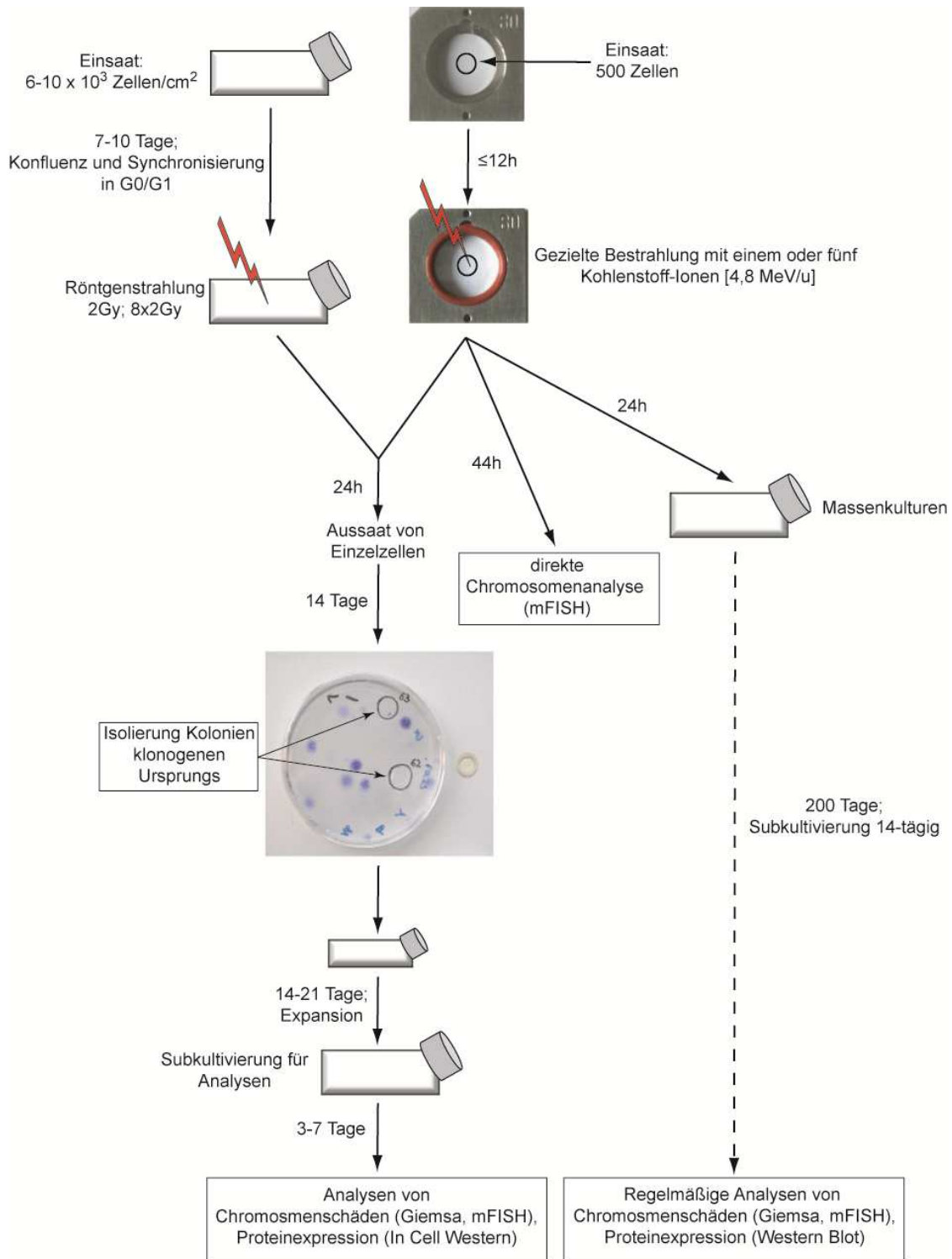
Zellzahlen zu erreichen. Die Isolierung der Kolonien erfolgte mittels eines Glaszylinders mit einer Höhe von 1 cm und einem Durchmesser von 0,5 mm. Dazu wurde das Medium aus den Kulturgefäßen dekantiert und die Glaszylinder, die zuvor an der Unterseite mit steriler Vaseline zwecks Abdichtung beschichtet wurden, über die zu isolierenden Kolonien gesetzt. In die Glaszylinder wurde ein Volumen von 150 µl Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und die Zellen damit für 5 min bei 37°C inkubiert. Die so abgelösten Zellen der Kolonien wurden direkt in Kulturgefäße (12,5 cm<sup>2</sup>) überführt und für 14-21 Tage kultiviert. Die Kulturgefäße aus denen die Kolonien isoliert wurden, wurden mit Methylenblau-Lösung (Anhang A.2) gefärbt, um anhand der gefärbten Kolonien das relative zelluläre Überleben für die Mikrosonden-Experimente zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.3.1). Ein so gefärbtes Kulturgefäß, von dem zwei Kolonien isoliert wurden, ist in Abbildung 2.1 gezeigt. Standen ausreichende Zellzahlen zur Verfügung, wurden Chromosomenanalysen (Giemsa, mFISH) und Analysen der Proteinexpression (In Cell Western) der klonogenen Nachkommen bestrahlter Zellen durchgeführt.

### **Langzeitkultivierung bestrahlter Zellen in Massenkulturen**

Gezielt mit einem Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlte Zellen wurden neben Kolonien zusätzlich in Massenkulturen kultiviert. Die Zellen wurden dazu ebenfalls 24 h nach der Bestrahlung mit einem geringen Volumen von 150 µl Trypsin/EDTA-Lösung aus den Kammern abgelöst. Jeweils 400-500 Zellen aus 2 Kammern wurden zusammengeführt und direkt in Kulturgefäße (Ø = 3mm) eingesät. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden diese nach Abschnitt 2.1.2 subkultiviert und bei ausreichender Zellzahl in regelmäßigen Abständen Chromosomenanalysen (Giemsa, mFISH) sowie Analysen der Proteinexpression (Western-Blot) vorgenommen.

Alle experimentellen Abläufe vor und nach Bestrahlung der Zellen zur Untersuchung der genomischen Stabilität in den Nachkommen bestrahlter Zellen, sind schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt.

## 2. Material und Methoden



**Abbildung 2.1:** In Abschnitt 2.2.2 beschriebener experimenteller Ablauf der Bestrahlung und anschließenden Kultivierung der Zellen zur Untersuchung der genomischen Stabilität in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen. Die Zellen wurden mit Röntgenstrahlung oder an der Mikrosonde gezielt mit einer definierten Anzahl von einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlt. Die Zellen wurden 24 h nach der Bestrahlung subkultiviert und als Einzelzellen bzw. Kolonien klonogenen Ursprungs oder für die gezielte Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] zusätzlich in Massenkulturen aus 2 Bestrahlungsproben weiterkultiviert. Eine mFISH-Analyse direkter Chromosomenschäden wurde 44 h nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.3 Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung

Die in dieser Arbeit durchgeführte Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurde mit einer Isovolt DS1 Röntgenröhre der Firma Seifert (Bridge Port, USA) mit einer Wolframanode durchgeführt. Diese wurde mit einer Beschleunigerspannung von 250 kV [ $2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ] und einem Kathodenstrom von 16 mA gefahren. Ein Filtersystem aus 7 mm Beryllium, 1 mm Aluminium und 1 mm Kupfer war dem Austrittsfenster der Röntgenstrahlung vorgelagert, welches die langwelligen Anteile der Röntgenstrahlung absorbiert. Dosis und Dosisleistung wurden mit dem Dosimeter SN4 (PTW Freiburg) ermittelt und digitalisiert. Der Fokusabstand vom Brennpunkt des Strahls zur Probe wurde auf die Größe der verwendeten Kulturgefäße angepasst, um eine homogene Bestrahlung der zu bestrahlenden Fläche zu erreichen. Diese wurde durch Messung der Dosisleistung an den Rändern der zu bestrahlenden Fläche kontrolliert. Die Kulturgefäße wurden in waagerechter Position bestrahlt und die Dosisleistung für alle Bestrahlungen auf  $1 \text{ Gy/min}$  festgelegt.

### 2.2.4 Bestrahlung der Zellen mit Kohlenstoff-Ionen

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bestrahlungen wurden für niederenergetische Kohlenstoff-Ionen am UNILAC und für hochenergetische Kohlenstoff-Ionen am SIS durchgeführt. Diese werden im Folgenden nur noch als „broadbeam“-Bestrahlungen bezeichnet. Die Energien der Kohlenstoff-Ionen auf den jeweiligen Strahlzielen beliefen sich am UNILAC auf  $9,8 \text{ MeV/u}$  mit einem LET von  $170 \text{ keV}/\mu\text{m}$  und am SIS auf  $100 \text{ MeV/u}$  mit einem LET von  $23 \text{ keV}/\mu\text{m}$ . Die gezielte Bestrahlung von Einzelzellen mit Kohlenstoff-Ionen wurde an der Mikrosonde der GSI durchgeführt. Die dort extrahierten Ionen entstammen ebenfalls dem UNILAC, weisen aber im Vergleich zu „broadbeam“-Bestrahlungen eine niedrigere Energie auf dem Strahlzeil, d.h. den Zellen, von  $4,8 \text{ MeV/u}$  mit einem LET von  $290 \text{ keV}/\mu\text{m}$  auf.

Die Dosis der Kohlenstoff-Ionen wird bei „broadbeam“-Bestrahlungen durch die Bestrahlung mit der entsprechenden Anzahl an Strahlpulsen appliziert. Die Anzahl der für eine bestimmte Dosis benötigten Pulse berechnet sich nach den Gleichungen 1.3 und 1.4 und mit Gleichung 1.5 lässt sich die aus Fluenz und LET resultierende Dosis berechnen. Bei Bestrahlung von biologischen Proben wird näherungsweise die Dichte von Wasser verwendet ( $1 \text{ g/cm}^3$ ). Zur Ermittlung des Kalibrierungsfaktors wurden Kernspurdetektoren aus CR-39 mit einer definierten Anzahl an Pulsen bestrahlt und die nach Ätzung mit 11 molarer Natronlauge sichtbaren Teilchenspuren pro Flächeneinheit gezählt. Die Anzahl der eingestrahlten Strahlpulse wurde über einen Sekundärelektronen-Transmissionszähler gesteuert, dessen Sekundärelektronenstrom proportional zur Strahlintensität ist. Im Gegensatz zu „broadbeam“-Bestrahlungen

## 2. Material und Methoden

werden bei Bestrahlung an der Mikrosonde der GSI die Zellen nicht mit Strahlpulsen sondern einzelne Zellen gezielt mit einer definierten Anzahl an Ionen bestrahlt.

### **Bestrahlung der Zellen mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen am UNILAC**

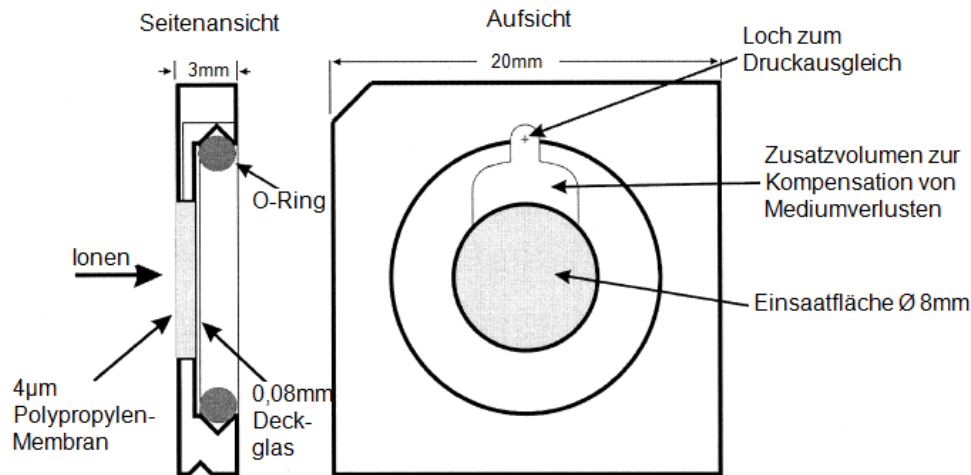
Für eine Bestrahlung am UNILAC der GSI Darmstadt wurden die Zellen in Kulturschalen ( $\varnothing = 35$  mm) ausgesät. Vor der Bestrahlung wurde der Mediumüberstand entfernt und die Kulturschalen vertikal in mit serumfreiem Medium gefüllte Magazine eingesetzt. Die Magazine wurden luftdicht verschlossen, in einem geschlossenen Behälter zum Bestrahlungsplatz gebracht und dort in die verschließbare biologische Bestrahlungsanlage (Becher *et al.* 2001, Kraft *et al.* 1980) eingesetzt und geöffnet. Die Kulturschalen wurden mit einem Sauggreifer nach oben aus dem Magazin gehoben, im horizontalen Strahlengang des Beschleunigers positioniert und bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Kulturschalen wieder im Magazin an deren angestammten Platz positioniert, dieses verschlossen und zum Arbeitsplatz, an dem die weitere Aufarbeitung der Zellen stattfand transportiert. Da niederenergetische Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] am UNILAC nur über eine sehr geringe Eindringtiefe von ca. 400  $\mu\text{m}$  verfügen, müssen die Zellen ohne Mediumüberstand bestrahlt werden. Dieses läuft beim Herausheben der Kulturschalen aus den Magazinen ab, allerdings bildet sich am unteren Rand des Kulturgefäßes ein Mediumtropfen, unter dem die Zellen nicht bestrahlt werden. Diese werden nach der Bestrahlung mit einem sterilen Wattestäbchen von der Kulturschale entfernt.

### **Bestrahlung der Zellen mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen am SIS**

Die Bestrahlung der Zellen mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] am SIS wurde in Kulturflaschen vorgenommen. Da die Kulturflaschen in vertikaler Position bestrahlt wurden, wurde das Kulturmedium entfernt und die Kulturflaschen komplett mit serumfreiem Medium aufgefüllt, um ein Austrocknen der Zellen während der Bestrahlung zu vermeiden. Die Kulturflaschen wurden in einen verschlossenen Behälter zum Strahlplatz transportiert, dort senkrecht positioniert und bestrahlt. Eine homogene Strahlführung und Bestrahlung aller Zellen wird durch das magnetische Scanner-Verfahren (Haberer *et al.* 1993) erreicht. Inhomogenitäten der Bestrahlung liegen bei maximal 10 %. Nach der Bestrahlung wurden die Kulturflaschen in einem geschlossenen Behälter für eine weitere Aufarbeitung zurück zum Arbeitsplatz transportiert.

### Bestrahlung der Zellen mit Kohlenstoff-Ionen an der Mikrosonde

Für eine Bestrahlung von Zellen an der Mikrosonde der GSI mussten die Zellen in speziellen Kammern kultiviert werden, die eine horizontale Positionierung zwischen dem Vakuumfenster des Strahlausgangs und dem Objektiv des Mikroskops zur Zellkernerkennung erlauben. Eine Kammer ist schematisch nach Heiss *et al.* (Heiss *et al.* 2006) in Abbildung 2.2 dargestellt.

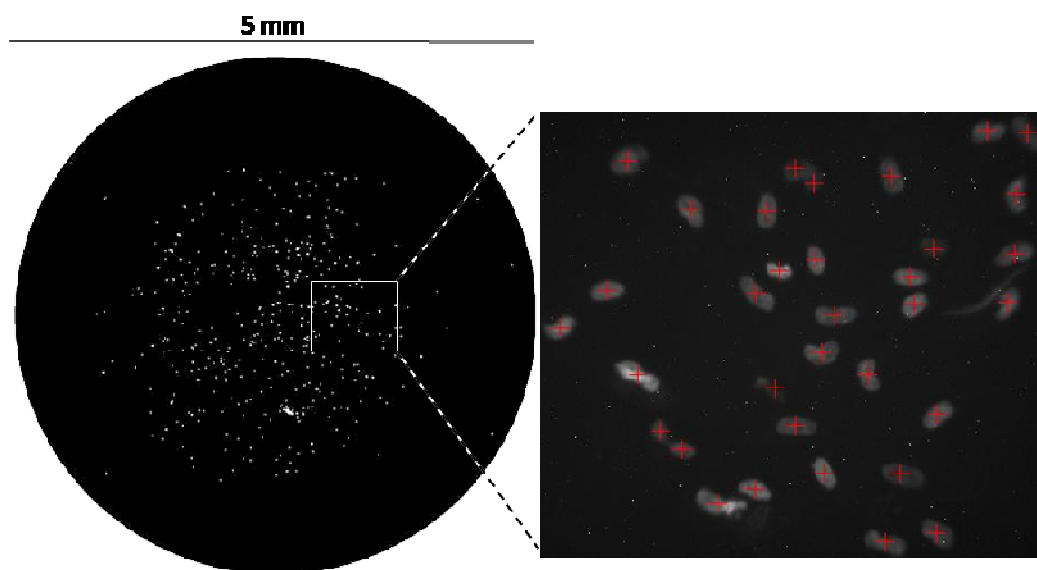


**Abbildung 2.2:** Bestrahlungskammer für Bestrahlungen an der Mikrosonde. Modifiziert nach Heiss *et al.* (Heiss *et al.* 2006).

Die quadratische Kammer mit einer Seitenlänge von 20 mm besteht aus rostfreiem Stahl (Typ 1.4301) mit einem zentralen Ausschnitt ( $\varnothing = 8$  mm). Die Seite der Kammer, die zum Strahlaustrittsfenster gerichtet ist, wird mit einer nicht-fluoreszierenden Polypropylenfolie (Stärke 4  $\mu\text{m}$ ) verschlossen. Diese wird mittels herkömmlichen Kerzenwachses (Stearin), das nicht toxisch für die Zellen ist, an der Kammer befestigt. Um ein Wachstum von Zellen auf der Polypropylenfolie zu erreichen, muss diese mit einem Proteingemisch (Cell-Tak, Anhang A.1) in einer Konzentration von 3,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  beschichtet werden. Die Beschichtung der Kammer wurde frühestens am Vortag der Bestrahlung vorgenommen und die Kammern bis zur Zelleinsaat bei 4°C gelagert. Während der Bestrahlung wird die Kammer aufgrund der horizontalen Positionierung mit einem Deckglas verschlossen und mit einem O-Ring abgedichtet. Da für die Dauer der Bestrahlung von etwa 30 min der Gasaustausch nicht in vollem Umfang gewährleistet ist, wurde das Kulturmedium mit HEPES-gepuffertem Kulturmedium (20 mM, pH 7,6) ausgetauscht. Dieses wurde direkt nach der Bestrahlung mit normalem Kulturmedium ersetzt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die genaue Bestrahlung aller Zellen einer Kammer mit einer definierten Anzahl von Ionen. Um die Zeit der Bestrahlung und damit die durch den mangelnden Gasaustausch verursachten zellulären Schäden möglichst gering zu halten, wurde nicht die gesamte Einsaatfläche der Kammer genutzt (Eine zielgenaue Be-

## 2. Material und Methoden

strahlung der gesamten Einsaatfläche würde das limitierende Zeitfenster von 30 min deutlich überschreiten). Es wurde daher eine Einsaat von 500 Zellen im Zentrum der Einsaatfläche, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, vorgenommen. Die Zellen befanden sich damit in einem Bestrahlungsfeld mit einem Durchmesser von 5 mm, dass innerhalb von maximal 30 min gezielt bestrahlt werden konnte. Für eine fluoreszenzmikroskopische Zellkernerkennung wurden die Zellen eine Stunde vor der Bestrahlung einer Vitalfärbung mit dem interkalierenden Fluorochrom Hoechst 33342 (200 nM in 300  $\mu$ l Medium) unterzogen. Die an der Mikrosonde vorliegende automatische Ziel- bzw. Zellkernerkennung wurde dabei manuell überprüft. Ein fluoreszenzmikroskopische erfasstes Bestrahlungsfeld sowie ein Rasterfeld sind in Abb 2.3 dargestellt.



**Abbildung 2.3:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Hoechst 33342-gefärbter Zellkerne eines Bestrahlungsfeldes mit einem Durchmesser von 5 mm sowie der vergrößerte Ausschnitt eines von 219 Rasterfeldern eines Bestrahlungsfeldes. Mit roten Kreuzen markierte Zellkerne wurden mit einer definierten Anzahl an Ionen bestrahlt.

Die Ionen aus dem UNILAC erreichen die Mikrosonde durch eine Öffnung des Strahlausgangs mit einem Durchmesser von 10  $\mu$ m und werden mittels eines vierpoligen magnetischen Objektives mit einem Durchmesser von 500 nm fokussiert. Beugende Magnete erlauben eine Bewegung des Fokus von 1,5 mm senkrecht zum Strahlausgang. Die Bestrahlung der Zellen mit einer definierten Anzahl von Ionen wird durch eine elektrostatische Blende beim Strahleingang mit einer Reaktionszeit von 200 ns gewährleistet. Die Detektion der einzelnen Ionen erfolgt über einen Kanalelektronenvervielfacher und die Sekundärelektronen, die bei einem Ionendurchgang durch das Material des Strahlaustrittsfensters emittiert werden. Weitere Detektoren im Strahlengang würden eine ungewünschte Streuung der Ionen verursachen. Das Strahlaustrittsfenster besteht aus 200 nm dickem Siliciumnitrid auf einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>, das, um die Ausbeute an Sekundärelektronen zu erhöhen, zusätzlich mit

## 2. Material und Methoden

Schichten von 20 nm Gold und 50 mg/cm<sup>2</sup> Cäsiumjodid überzogen ist. Für Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] wird eine Effizienz der Detektion von 99,5 % erreicht (Fischer *et al.* 2003). Die Kammer wird direkt hinter dem Vakuumfenster auf einem Objektisch, bewegbar in X- und Y-Richtung plziert. Ein Epifluoreszenzmikroskop (Leica TCS) zur Zellerkennung befindet sich direkt hinter der Kammer. Da eine rein lichtmikroskopische Zellkernerkennung mittels Phasenkontrast keine ausreichenden Ergebnisse liefert und zu ungenau für eine gezielte Bestrahlung von Zellkernen ist, wird diese mittels fluoreszenzmikroskopischer Erkennung der mit dem interkalierenden Fluorochrom Hoechst 33342 markierten Zellkerne durchgeführt. Die Beleuchtung erfolgt mit einer 100 Watt Quecksilber-Lampe und die Expositionszeit wird mittels einer Blende minimiert. Diese wird geschlossen, sobald eine ausreichende Anzahl Photonen zur Zellkernerkennung von einer monochromen Ladungsgekoppelten Kamera (charged coupled device, CCD) gesammelt wurden. Dabei werden die Zellen mit UV-Strahlung und einer Dosis von etwa 30 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt (Heiss *et al.* 2006). Die Ablenkungsspannung, um einen Zellkern in der so generierten fluoreszenzmikroskopischen Abbildung zu treffen, wird vor der Bestrahlung mittels eines dünnen Szintillators an der Probenposition und direkter mikroskopischer Visualisierung bestimmt. Die Ungenauigkeit der Bestrahlung und damit die Abweichung vom vorgegebenen Ziel im Zellkern liegt lediglich bei  $1,3 \pm 0,7 \mu\text{m}$  (Barberet *et al.* 2006).

## 2.3 Analysenmethoden

### 2.3.1 Zellinaktivierung durch Bestrahlung

Durch Bestrahlung von Zellen kommt es zur Abnahme deren Teilungsfähigkeit und damit einer verminderten Fähigkeit makroskopisch sichtbare Kolonien auszubilden. Auslöser dafür sind lethale Strahlenschäden, die zum reproduktiven Zelltod führen (Hall 1994). Die Kriterien der Koloniebildung der vorliegenden Arbeit wurden von Puck und Marcus übernommen (Puck und Marcus 1955). Eine überlebende Zelle ist demnach in der Lage innerhalb eines Zeitraumes von 14 Tagen der Kultivierung, d.h. nach einer Verzögerungsphase und anschließenden 10-15 Zellzyklen á 24 h, mehr als 50 Tochterzellen zu bilden. Für alle Bestrahlungsexperimente der vorliegenden Arbeit wurde nach der Bestrahlung die weitere Aufarbeitung zur Bestimmung des relativen zellulären Überlebens immer 24 h nach der Bestrahlung vorgenommen („delayed plating“). Diese Erholungsphase ermöglicht den Zellen eine Reparatur der Strahlenschäden, wodurch der Anteil überlebender Zellen im Gegensatz zu einer Aussaat direkt nach der Bestrahlung („immediate plating“) zunimmt. Die bestrahlten Zellen wurden trypsiniert (siehe Abschnitt 2.1.2), die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 2.1.2) und

## 2. Material und Methoden

die Zellen mit einer niedrigen Einsaatdichte ausgesät. Diese lag für unbestrahlte Fibroblasten bei 1,3 Zellen/cm<sup>2</sup> und die Einsaatdichten für bestrahlte Zellen lagen höher und wurden abgeschätzt. Für die Kultivierung wurde aufgrund der niedrigen Zelldichte Medium mit 20 % FCS verwendet. Nach 14 Tagen wurden die Zellen für 30 min mit Methylenblau-Lösung überschichtet und Kolonien mittels einer Stereolupe gezählt, die aus mehr als 50 Zellen bestanden. Proben sowie Kontrollen wurden jeweils in Triplikaten angesetzt und analysiert.

Das zelluläre Überleben stellt das Verhältnis zwischen der Koloniebildungsfähigkeit (plating efficiency, PE) der bestrahlten und nicht-bestrahlten Zellen dar. Die PE berechnet sich nach folgender Formel:

$$PE = \frac{N_k}{N_0} \quad (2.2)$$

PE     Plating efficiency

N<sub>k</sub>     Anzahl der Kolonien

N<sub>0</sub>     ursprünglich eingesäte Zellzahl

Für das relative zelluläre Überleben ergibt sich folgende Beziehung:

$$S = \frac{PE_D}{PE_K} = \frac{N_K(D)}{N_0} \times PE_K \quad (2.3)$$

S     Überleben

PE<sub>K</sub>   PE der Kontrolle

PE<sub>D</sub>   PE der bestrahlten Zellen

N<sub>K</sub>(D) Anzahl der Kolonien der mit der Dosis D bestrahlten Zellen

N<sub>0</sub>     Anzahl der ursprünglich eingesäten Zellen

Da in der vorliegenden Arbeit nur für ausgewählte Dosen das relative zelluläre Überleben nach Bestrahlung bestimmt und mit Daten der Literatur verglichen wurde, wurden keine Dosiseffektkurven durch semi-logarithmischen Auftrag der Überlebensdaten erstellt.

### 2.3.2 Bestimmung intrazellulärer ROS-Mengen

Die Bestimmung der intrazellulären ROS-Mengen wurde mittels Messung der Oxidation ROS-spezifischer Fluorochrome durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluo-

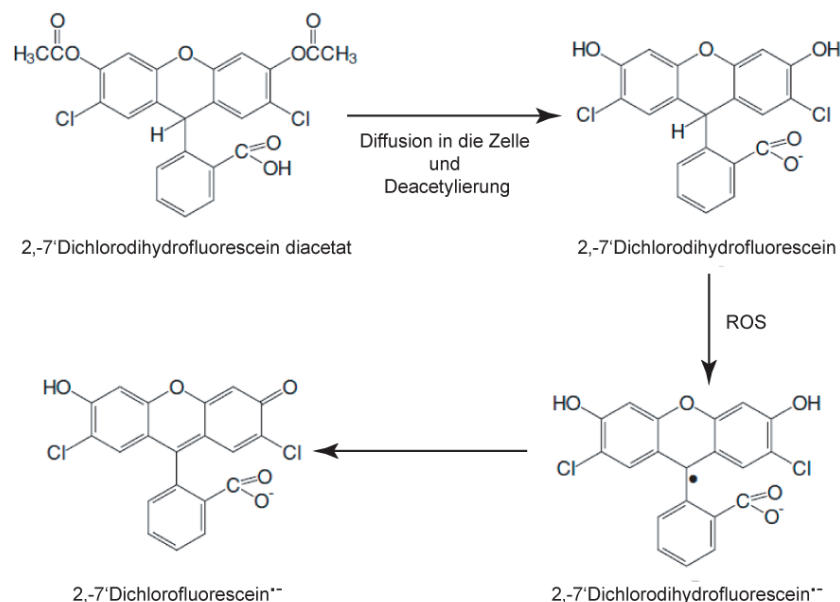


## 2. Material und Methoden

rochrome 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA) und Dihydroethidium (DHE), die unterschiedliche Spezifitäten für ROS aufweisen verwendet, um ein möglichst breites Radikalspektrum nachzuweisen. Die Spezifitäten sowie Nachweisreaktionen der beiden Fluorochrome werden im Folgenden beschrieben. Beide Fluorochrome gelangen durch einfache Diffusion in die Zellen.

### Bestimmung intrazellulärer ROS-Mengen mit DCFH-DA

DCFH-DA wird intrazellulär durch endogene Esterasen zu 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) deacetyliert und zeigt durch die entstandene Polarität eine geringere Membranpermeabilität. Das Reaktionsschema für DCFH-DA ist in Abbildung 2.4 dargestellt.



**Abbildung 2.4:** Reaktionsschema für DCFH-DA. DCFH-DA gelangt durch einfache Diffusion in die Zelle und wird im Zytosol durch Esterasen hydrolysiert und damit zu DCFH deacetyliert. Durch die so entstandene Polarität wird die Diffusion aus der Zelle deutlich vermindert. Es erfolgt die Oxidation von DCFH durch ROS über das intermediäre 2',7'-Dichlorofluorescein-Radikal ( $\text{DCF}^{\bullet-}$ ) zu dem fluoreszierenden Produkt 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF). Modifiziert nach Halliwell und Whiteman (Halliwell und Whiteman 2004).

Das so entstandene DCFH wird im Zytosol durch ROS über das intermediäre Zwischenprodukt des 2',7'-Dichlorofluorescein-Radikals ( $\text{DCF}^{\bullet-}$ ) zu fluoreszierendem 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF,  $\lambda_{\text{ex}}$  504 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  529 nm) oxidiert. Die Oxidation von DCFH erfolgt durch Peroxyl-, Alkoxyl-, Nitrat-, Carbonat- und Hydroxylradikale oder Peroxynitrit. Eine direkte Oxidation durch Wasserstoffperoxid oder das Superoxid-Anion erfolgt nicht. Für eine Detektion von Peroxiden durch DCFH ist die Gegenwart von Metall bzw. Eisen-Ionen für eine Fenton-Reaktion oder von Häm-Proteinen (Cytochrom C, Peroxidase) nötig. Diese erzeugen ausgehend von Wasserstoff-Peroxid Radikale, die mittels DCFH detektiert werden können (Lawrence *et al.* 2003, Tampo *et al.* 2003, Ohashi *et al.* 2002). Durch die Oxidation von DCF

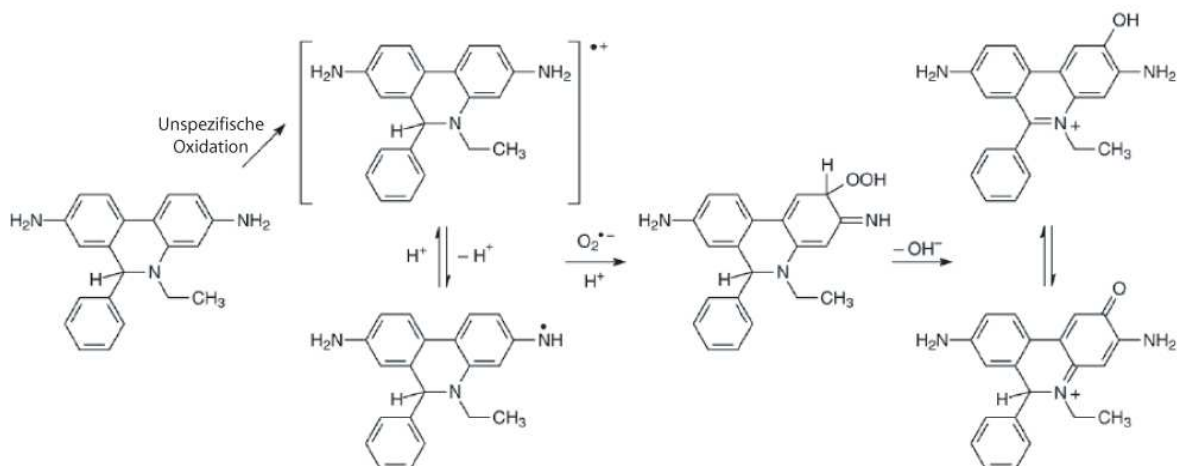
## 2. Material und Methoden

zu Phenoxyl-Radikalen über Reaktionen mit intrazellulären antioxidativen Enzymen wie GSH oder NADH, kann DCF selbst weitere Radikale bilden (Rota *et al.* 1999). Zusätzlich weist das verwendete DCFH-DA hohe Photo- und Autooxidationsraten auf (Halliwell und Whiteman 2004).

Aufgrund dieser Eigenschaften und ungewünschten intrazellulären Nebenreaktionen des DCFH-Moleküls, wird der Nachweis von intrazellulären ROS mittels der DCFH-DA-Methode als Indikator eines allgemeinen zellulären oxidativen Stresses herangezogen, während Aussagen über spezifische Radikale schwierig sind.

### Bestimmung intrazellulärer ROS-Mengen mit DHE

DHE ist ein häufig zum Nachweis des Superoxid-Anions verwendetes Fluorochrom. Der Reaktionsmechanismus der Oxidation von DHE zu 2-Hydroxyethidium durch das Superoxid-Anion ist in Abbildung 2.5 dargestellt.



**Abbildung 2.5:** Reaktionsschema der DHE-Oxidation durch das Superoxid-Anion. Nach unspezifischer Oxidation von DHE zu einem Radikal-Kation, kommt es zu einer Addition des Superoxid-Anions und über das intermediäre Zwischenprodukt eines Hydroperoxides entsteht 2-Hydroxyethidium. Modifiziert nach Wardmann (Wardman 2007).

Durch die Bildung des 2-Hydroxyethidiums und dessen Interkalation in die DNA kommt es zu einer 50-100-fachen Steigerung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{ex}}$  508 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  605 nm). Es liegen allerdings Hinweise vor, dass es sich bei dem gebildeten Produkt um ein Ethidium-Derivat handelt (Zhao *et al.* 2003). Da die hauptsächliche intrazelluläre Quelle des Superoxid-Anions die mitochondriale Elektronentransportkette darstellt, wird davon ausgegangen, dass die DHE-Fluoreszenz weitgehend in den Mitochondrien lokalisiert ist (Robinson *et al.* 2006). Unspezifische Reaktionen von DHE, wie die Oxidation durch Häm-Proteine (Cytochrom c) oder die Interkalation in die DNA, können zu einer weiteren und nicht direkt durch

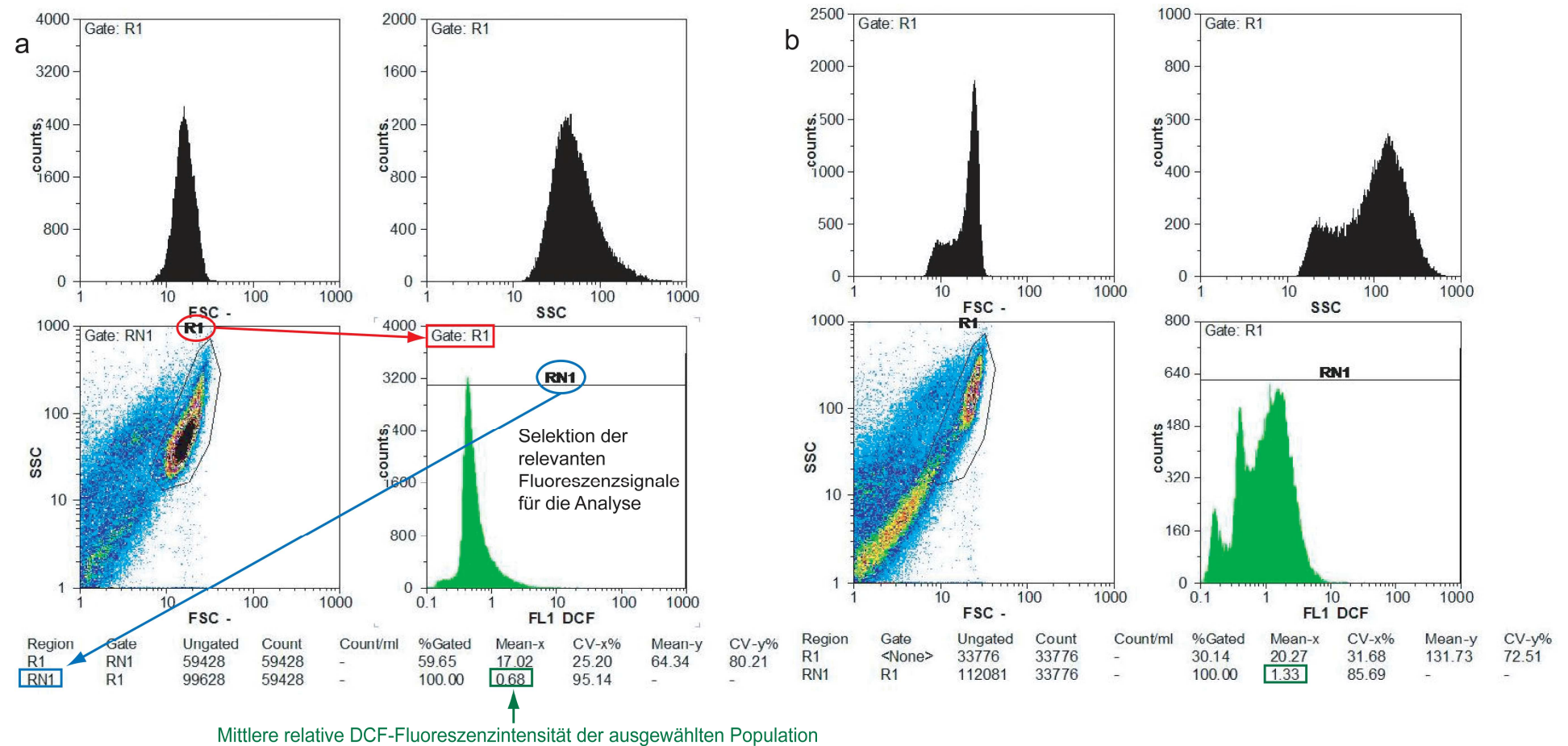
## 2. Material und Methoden

ROS verursachte Intensivierung des Fluoreszenzsignals führen (Benov *et al.* 1998, Buxser *et al.* 1999).

### Durchflusszytometrische Fluoreszenzmessung

Die durch die Oxidation der ROS-spezifischen Fluorochrome DCFH-DA und DHE entstandene Fluoreszenz bzw. deren Intensitätssteigerung wurde in Einzelzellsuspensionen mittels durchflusszytometrischer Messungen ermittelt. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellzahl ermittelt (siehe Abschnitt 2.1.2). Die Zellen wurden anschließend bei 100 g/min abzentrifugiert, in auf 37°C vorgewärmten PBS<sup>-/-</sup> resuspendiert und bei 100 g/min erneut zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter Lichtausschluss statt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5/\text{ml}$  in auf 37°C vorgewärmten Lösungen von PBS<sup>-/-</sup> mit DCFH-DA (25  $\mu\text{M}$ ) und DHE (4  $\mu\text{M}$ ) resuspendiert. DCFH-DA-Proben wurden für 30 min und DHE-Proben für 10 min bei 37°C inkubiert. In direktem Anschluss an die Inkubation erfolgte die Messung der Zellen am Durchflusszytometer PAS III (Anhang A.7) bei Raumtemperatur. Die Anregung beider Fluorochrome erfolgte durch einen Argon Laser ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ). Die DCF-Fluoreszenz wurde im sogenannten FL1/FITC-Kanal ( $\lambda_{\text{em}} 515\text{-}550 \text{ nm}$ ) und die 2-Hydroethidin-Fluoreszenz im FL2/PI-Kanal ( $\lambda_{\text{em}} 570\text{-}600 \text{ nm}$ ) detektiert. Die Selektion der Zellpopulation für die Messung, das sogenannte "Gating", erfolgte über den Auftrag des Seiten- (side scatter, SSC) gegen das Forwardstreuung (forward scatter, FSC). Diese, von der Fluoreszenz der Zellen unabhängigen Parameter, erlauben durch die Wiedergabe des Volumens (FSC) sowie der Granularität (SSC) der Zellen eine eindeutige Selektion der Population. Es wurden pro Messung mindestens  $10^4$  Zellen mit der FlowMax Operating and Analysis Software (Anhang A.7) analysiert. Mittels dieser hier verwendeten Methode können keine quantitativen Aussagen über die intrazellulären Radikalkonzentrationen getroffen werden. Es wurde daher das relative Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensitäten der bestrahlten Proben zu den jeweiligen Kontrollpopulationen gleichen zellulären Alters ermittelt. Für die Untersuchung der Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation in nicht bestrahlten Fibroblasten, wurde das relative Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensitäten *in vitro* gealterter zu jungen Zellen bestimmt. In Abbildung 2.6 ist exemplarisch die graphische Analyse mittels der FlowMax-Software dargestellt.

## 2. Material und Methoden



**Abbildung 2.6:** Histogramme und Streudiagramme einer durchflusszytometrischen Messung intrazellulärer ROS-Mengen der vorliegenden Arbeit mittels der Oxidation des DCFH-DA-Fluorochroms. Die zu analysierende Population wurde anhand des SSC/FSC-Streudiagramms ausgewählt (Gate R1). Über das Gate RN1 wurde die mittlere relative Fluoreszenzintensität, in diesem Beispiel des FL1-Kanals für DCF ausgewählt. Dargestellt ist die Analyse einer (a) Kontrollpopulation sowie einer (b) bestrahlten Population, die eine 2-fache Zunahme der mittleren relativen DCF-Fluoreszenzintensitäten (RN1-Gate: Mean-x) zeigt.

## 2. Material und Methoden

### 2.3.3 Chromosomenanalysen

#### 2.3.3.1 Chromosomenpräparation

Für Chromosomenpräparationen wurden Zellen semikonfluent ( $6000 \text{ Zellen/cm}^2$ ) eingesät. Die Zellen wurden anschließend maximal drei Tage unter Standardbedingungen kultiviert (Abschnitt 2.1.2), um eine Konfluenz und damit Synchronisierung der Zellen zu vermeiden. Dem Medium wurde Colcemid (siehe Anhang A.1) in einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Colcemid ist ein synthetisches Analogon von Colchicin, einem wasserlöslichen Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*). Es bindet an Tubulin und verhindert dessen Polymerisierung, wodurch es nicht zur Bildung der Mitosespindel und damit der Segregation der Chromosomen zu den Spindelpolen in der Mitose kommt. Die Zellen erreichen so zwar während der Mitose die Metaphase, akkumulieren aber in diesem Zustand.

Vier Stunden nach der Colcemidzugabe wurde das Kulturmedium und die zum Waschen der Zellen verwendete EDTA/Trypsin-Lösung in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 2.1.2 beschrieben trypsinisiert, vereinzelt und zusammen mit dem Medium zentrifugiert (100 g, 6 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im verbleibenden Rest resuspendiert. Anschließend erfolgte eine hypotonische Behandlung der Zellen mit 10 ml temperierter KCl-Lösung ( $37^\circ\text{C}$ , Anhang A.2.1). Diese wurde tropfenweise über einen Zeitraum von 8 min zugegeben. Die hypotonische Behandlung bewirkt eine osmotische Diffusion von Wasser in die Zellen, wodurch das Chromatin quillt und die Chromosomen besser voneinander getrennt werden. Nach erneuter Zentrifugation (100 g, 8 min) wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 8 min Fixativ (Anhang A.2.1) zugegeben. Durch diese Fixierung wird die Zellstruktur konserviert, die Aktivität von Nukleasen und gewebeabbauenden Enzymen gering gehalten sowie die Zellmembran elastisch fixiert (Obe und Müller 1999). Nach 30-minütiger Inkubation wurde erneut zentrifugiert (120 g, 10 min), der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und die Zellen nochmals mit Fixativ gewaschen. Nach erneutem Abzentrifugieren (120 g, 10 min) wurde das Pellet in einem möglichst geringem Volumen Fixativ aufgenommen. Zum Spreiten und Fixieren der Metaphasen wurden  $20 \mu\text{l}$  der Zellsuspension auf saubere, mit Millipore benetzte Objektträger getropft. Die Präparate wurden über Nacht an der Luft getrocknet und im Anschluss entweder direkt mit Giemsa gefärbt (Abschnitt 2.3.3.3) oder für Hybridisierungen (Abschnitt 2.3.3.4) bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.3.2 Frühzeitige Chromosomenkondensation

Mittels der frühzeitigen Chromosomenkondensation (premature chromosome condensation, PCC) kann eine Kondensation von Chromosomen während der Interphase des Zellzyklus mittels des Phosphataseinhibitors Calyculin-A herbeigeführt werden. Diese Technik ermöglicht insbesondere die zytogenetische Analyse von Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus, wodurch im Vergleich zur Analyse von Metaphasen, bei der die Zellen selbständig die Mitose erreichen müssen, die Auswirkungen eines strahleninduzierten Zellzyklusarrestes reduziert werden (Gotoh und Durante 2006, Gotoh *et al.* 1999). Da Fibroblasten überwiegend einen strahleninduzierten Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus zeigen und Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus durch den Einsatz von Calyculin schlechter kondensieren als in der G2-Phase, kommt dieser Effekt nicht so deutlich zum tragen wie z.B. bei Lymphozyten, die einen Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus zeigen.

Die PCC-Methode wurde in Kombination mit einer Colcemidbehandlung (Abschnitt 2.3.3.1) in der vorliegenden Arbeit nur bei Zellen durchgeführt, die in Mikrosonden-Experimenten mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] pro Zellkern bestrahlt wurden. Daher musste diese Technik direkt an wenigen Zellen (400-500) in den Mikrosondenkammern angewendet werden. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung für 44 h in den Kammern inkubiert, da eine Zellzyklusprogression und ein Maximum an 1. Mitosen in Fibroblasten nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [11 MeV/u] in diesem Zeitraum beobachtet wurde (Tenhumberg *et al.* 2007). Das Medium wurde vorsichtig abgezogen und durch 200 µl Medium mit 2 % FCS und 1 µg/ml Colcemid ersetzt. Die Zellen wurden so für weitere 4 h inkubiert und 45 min vor der Chromosomenpräparation wurde Calyculin A (50 nM, Anhang A.1) zu den Zellen gegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit von insgesamt 4 h wurden die Zellen vereinzelt und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Ein Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung war nicht notwendig, da eine Behandlung der Zellen mit Calyculin A bereits zu einem Verlust der Adhärenz führt. Es wurden Zellen von bis zu 6 Mikrosondenkammern entweder der Kontrollen oder bestrahlten Zellen in ein Mikroreaktionsgefäß zusammengeführt und für 8 min bei 100g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen im Mediumrest vorsichtig resuspendiert. Es folgte die hypotonische Behandlung der Zellen mit 1 ml temperierter KCl-Lösung für 8 min. Der KCl-Lösung wurden bereits wenige Tropfen Fixativ zugesetzt. Die Zellen wurden zentrifugiert (100g, 8 min), der Überstand abgenommen, das Pellet resuspendiert und 1 ml Fixativ zu den Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Fixierung wurden die Zellen bei 120g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen erneut resuspendiert. Pro Mikroreaktionsgefäß wurde nach Abschnitt 2.3.1 nur ein Chromosomenpräparat angefertigt.

## 2. Material und Methoden

### 2.3.3.3 Giemsa-Färbung

Bei der Methode der Giemsa-Färbung handelt es sich um eine einheitliche Färbung der DNA aller Chromosomen. Sie dient in erster Linie der Erkennung von numerischen und asymmetrischen chromosomalen Aberrationen. In dieser Arbeit wurden aus den so gefärbten Chromosomenpräparaten neben strukturellen chromosomalen Aberrationen auch Mitoseindices, Polyploidie und Aneuploidie von Zellen bestimmt. Die auf Objektträger fixierten Zellen wurden für 10 min in 10 %-iger Giemsa-Lösung (Anhang A.2.1) gefärbt und in entionisiertem Wasser, gefolgt von Stadtwasser und entionisiertem Wasser gewaschen. Nach kurzem Abblasen mit Druckluft wurden die Präparate über Nacht an der Luft getrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

Alle Giemsa-gefärbten Chromosomenpräparate der vorliegenden Arbeit wurden von Larissa Melnikova ausgewertet.

### 2.3.3.4 Bestimmung des Mitose-Index

Der Mitose-Index einer Kultur gibt den Anteil mitotischer Zellen in der Population an. Dazu wurde das Verhältnis von Mitose- zu Interphase-Zellen aus Giemsa-gefärbten Chromosomenpräparaten der Kulturen ermittelt. Für jede Bestimmung wurden insgesamt 2000 Interphasezellen und Metaphasen ausgewertet.

### 2.3.3.5 Bestimmung der Anteile diploider und tetraploider Zellen

Der Anteil von diploiden und tetraploiden Zellen einer Population wurde aus Giemsa-gefärbten Chromosomenpräparaten bestimmt. Es wurden, bei einem Mitoseindex über 1 %, insgesamt 400 diploide und tetraploide Metaphasen ausgewertet. Bei einem Mitoseindex unter 1 % wurde diese Anzahl an Metaphasen nicht mehr erreicht und alle noch vorliegenden Metaphasen, aber mindestens 100, ausgewertet.

### 2.3.3.6 Bestimmung der Anteile aneuploider Zellen

Der Anteil aneuploider Metaphasen, d.h. Metaphasen, die einen Zugewinn oder Verlust von Chromosomen zeigten, wurde aus Giemsa-gefärbten Chromosomenpräparaten parallel zu den durchgeführten Analysen der strukturellen Aberrationen bestimmt. Es wurden mindestens 100 Metaphasen pro Chromosomenpräparat ausgewertet. War der mitotische Index zu niedrig, wurden alle verfügbaren Metaphasen einer Probe, aber mindestens 50, ausgewertet.

### 2.3.3.7 Multiplex Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (mFISH) und multiplex Banding (mBAND)

Die hier verwendete Technik der multiplex Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (mFISH) erlaubt eine simultane und unterschiedliche Darstellung aller 24 humanen Chromosomen mit einer Hybridisierung. Diese Methode dient vor allem der Analyse von interchromosomalen Austauschen und wird durch den Gebrauch von fünf verschiedenen Fluorochromen (DEAC, FITC, Spectrum Orange™, Texas®Red, Cy™5) und deren Kombination erreicht (kombinatorisches Markieren). mBAND-Hybridisierungen werden hingegen mit jeweils nur gegen ein Chromosom gerichteten Sonden durchgeführt. Die mBAND-Methode erlaubt eine Falschfarben-Bänderung einzelner Chromosomen durch kombinatorisches Markieren, die anhand der überlappenden Fluoreszenzspektren mit Fluorochromen konjugierten Sonden und deren Intensitätsprofilen generiert werden. Mit der mBAND-Methode können Bruchpunkte auf Chromosomen, Austausche zwischen homologen Chromosomen sowie intrachromosomale Aberrationen, wie parazentrischen Inversionen, detektiert werden. Für beide Methoden wurde das gleiche Hybridisierungsprotokoll angewendet.

Sämtliche Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte wurden nach dem von der Firma MetaSystems herausgegebenem Xcyte Lab Manual, adaptiert nach Fritz *et al.* (Fritz *et al.* 1998) und Rieder *et al.* (Rieder *et al.* 1998) durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden in 50 ml Coplin-Färbetrögen und, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die auf Objektträgern fixierten Zellkerne und Chromosomen wurden in einem ersten Schritt in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 %, 70 %, 50 % und 30 % Ethanol jeweils für eine min rehydriert. Der Objektträger wurde anschließend für eine min in 0,1 x Natriumchlorid-Natriumzitat-Puffer (Saline Sodium Citrat, SSC, Anhang A.1) gewaschen; darauf folgte eine 30-minütige Inkubation in 2 x SSC bei 70°C. Anschließend wurde der Färbetrog samt Objektträger aus dem Wasserbad genommen und bei Raumtemperatur langsam auf etwa 37 °C abgekühlt.

Während des Abkühlens wurde die Denaturierung der mFISH oder mBAND-Sonde (Anhang A.4) vorgenommen. Um ein Ausbleichen der mit den Sonden konjugierten Fluorochrome zu verhindern, wurde ab diesem Zeitpunkt unter Lichtausschluss gearbeitet. Pro Präparat wurde je ein Volumen von 7 µl der Sonden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei einer Temperatur von 75°C im Wasserbad denaturiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Um unspezifische Hybridisierungen von kurzen oder repetitiven Sequenzen zu reduzieren, wurden die Sonden für 30 min bei 37°C im Wasserbad vorhybridisiert.

Der abgekühlte Objektträger wurde in 0,1 x SSC-Puffer überführt und für eine min gewaschen. Auf die anschließende Denaturierung der Chromosomen in 0,07 M NaOH für eine min, folgten zwei Waschschrte in 0,1 x- und 0,2 x SSC-Puffer bei 4°C für je eine min. Die



## 2. Material und Methoden

Chromosomenpräparate wurden im Anschluss mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe von 30 %, 50 %, 70 % und 100 % Ethanol je eine min dehydriert und an der Luft getrocknet. Auf die denaturiert vorliegenden Chromosomenpräparate wurden die vorhybridisierten Sonden in einem Volumen von 7 µl in der Mitte des Präparats aufgetragen, ein 18 x 18 mm Deckglas aufgelegt und dieses mit einem Klebstoff (Fixogum) luftdicht verschlossen um ein Austrocknen zu verhindern. Der Objektträger wurde in diesem Zustand für 2-3 Tage bei 37°C in einem Wärmeschrank bei feuchter Atmosphäre aufbewahrt.

Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas vorsichtig vom Objektträger entfernt und nicht oder unspezifisch gebundene Sonde durch 5-minütiges Waschen bei 75°C in 1 x SSC-Puffer entfernt. Es folgte ein weiterer 5-minütiger Waschschrift in 4 x SSC-Tween-Puffer (SSCT, Anhang A.2.1). Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen der Probe wurden 50 µl Blockierungsreagenz (B-tect, Anhang A.1) auf den Objektträger gegeben, ein Deckglas (24 x 60 mm) aufgelegt und der Objektträger so für 10 min bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Nach kurzem Waschen der Probe für 5 min in 4 x SSCT wurde pro Objektträger eine Lösung aus 1 µl Detection 1+3-Reagenz (B-tect, Anhang A.1), welches das mit dem Fluorochrom Cy<sup>TM</sup>5 gekoppelte Streptavidin zur indirekten Detektion enthielt, und 50 µl Blockierungsreagenz hergestellt. Diese Lösung wurde auf das Präparat gegeben, der Objektträger mit einem 24 x 60 mm Deckglas abgedeckt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde anschließend zwei Mal für drei min in 4 x SSCT gewaschen. Nach einem Waschschrift in 1 x PBS<sup>-</sup> für 3 min und dem Trocknen des Objektträgers an der Luft folgte die Gegenfärbung mit 20 µl DAPI/Antifade-Lösung (B-tect, Anhang A.1). Auf den so präparierten Objektträger wurde ein 22 x 40 mm Deckglas aufgelegt und mit wenig Fixogum am Objektträger fixiert. Die Präparate wurden in diesem Zustand bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

### 2.3.3.8 Sequentielle mFISH- und mBAND-Färbung

Um ausgewählte chromosomale Aberrationen bezüglich der Bruchpunkte involvierter Chromosomen genauer zu untersuchen, wurde eine sequentielle mFISH- gefolgt von einer mBAND-Hybridisierung derselben Chromosomenpräparate durchgeführt. Die mFISH-Hybridisierung der Proben wurde dabei nach Abschnitt 2.3.3.7 mit anschließender Auswertung der Präparate nach Abschnitt 2.3.3.11 durchgeführt. Die Positionen der fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Metaphasen wurden für eine Relokalisierung nach der mBAND-Färbung gespeichert. Für die anschließende mBAND-Färbung des gleichen Chromosomenpräparats wurde das Deckglas abgenommen und der Objektträger zum Entfernen des DAPI/Antifade (Btect) kurz (~ 1 min) in 70 %-igem Ethanol gewaschen. Zur Entfernung der mFISH-Sonden folgte ein Denaturierungsschritt in 70 % Formamid in 2 x SSC (pH 7,0) bei

## 2. Material und Methoden

70°C für 3 min. Mit dem so behandelten Chromosomenpräparat wurde eine mBAND-Hybridisierung nach Abschnitt 2.3.3.7 durchgeführt. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden die Metaphasen der mFISH-Färbung über die Software auf dem Objektträger relokalisiert. Die mBAND-Auswertung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.3.11 beschrieben.

### 2.3.3.9 Sequentielle Telomer-FISH- und mFISH-Färbung

Telomere sind hochkonservierte repetitive Sequenzen, bestehend aus Hexameren (TTAGGG)<sub>n</sub>, die durch die Bildung spezieller Strukturen (T-Schleife) die linearen Enden der Chromosomen vor einer Erkennung als offene DNA-Enden, wie sie im Falle eines DNA-Schadens vorliegen, zu schützen. Da die Telomersequenzen der Chromosomen gleich sind, werden bei einer Hybridisierung mit einer gegen diese Sequenz gerichteten Fluorochrom-konjugierten Telomer-Sonde alle Telomere des Genoms markiert. Diese Methode kann als sogenannte QFISH-Methode zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignale, die proportional zur Länge der Telomer-Sequenzen sind, in Metaphasen sowie Interphasezellen genutzt werden (Perner *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Telomersignale nicht quantifiziert, da sich das Interesse auf die Lokalisation der Telomersequenzen in ausgewählten Chromosomen beschränkte. Um die Telomersequenzen dieser meist aberranten Chromosomen genau lokalisieren zu können, schloss sich der Telomer-FISH-Färbung eines Chromosomenpräparats in allen Fällen eine mFISH-Färbung an. Es wurde im Gegensatz zur mFISH und mBAND-Färbung, bei denen DNA-Sonden verwendet werden, eine Telomer-Sonde mit einem Peptidrückgrat (peptide nucleic acid, PNA) eingesetzt. PNA-Sonden sind relativ unpolar wodurch sich eine bessere Penetration der denaturierten Chromosomen und damit eine Hybridisierungseffizienz von annähernd 100 % ergibt (Uhlmann *et al.* 2000). Sämtliche Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte wurden nach dem Telomer PNA FISH Kit/Cy3-Protokoll der Firma DakoCytomation (Abschnitt A.1) durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden in 50 ml Coplin-Färbetrögen und, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur statt. Die Objektträger wurden in einem ersten Schritt für 2 min in Tris-gepufferter Saline (Tris-Buffered-Saline, TBS, DakoCytomation) rehydriert. Es folgte eine Fixierung der Chromosomenpräparate in 3,7 % Formaldehyd in TBS für 2 min und zwei Waschschrte in TBS für je 5 min. Anschließend wurden die Objektträger für 10 min in einer proteolytischen Enzymlösung (Proteinase K, Pre-Treatment Solution, DakoCytomation) inkubiert und 2 x für je 5 min in TBS gewaschen. Die Objektträger wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50, 70 und 90 % Ethanol bei 4°C dehydriert und an der Luft getrocknet. Die folgenden Arbeitsschritte fanden unter Lichtausschluss statt. Auf die Probe wurden 10 µl der Telomer PNA-Sonde aufgetragen, diese mit einem 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt und für 5 min bei 80°C auf einer

## 2. Material und Methoden

Heizplatte denaturiert. Der Objektträger mit der Telomer-Sonde wurde bei Raumtemperatur für 30 min bis 3 h hybridisiert. Das Chromosomenpräparat wurde anschließend für 1 min mit einer Spüllösung (Rinse Solution, DakoCytomation) und 5 min mit einer auf 65°C vorgeheizten Waschlösung (Wash Solution, DakoCytomation) behandelt. Der Objektträger wurde dann in der aufsteigenden Alkoholreihe aus 50, 70 und 90 % Ethanol bei 4°C dehydriert und an der Luft getrocknet. Für eine Gegenfärbung wurde das Chromosomenpräparat mit 20 µl DAPI/Antifade-Lösung (B-tect) und einem 22 x 40 mm Deckglas eingedeckt.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Metaphasen wurden nach Abschnitt 2.3.3.11 angefertigt und die Positionen der aufgenommenen Metaphasen gespeichert. Für die anschließende mFISH-Färbung der gleichen Chromosomenpräparate wurde das Deckglas abgenommen, die Objektträger zum Entfernen des DAPI/Antifade etwa eine min in 70 % Ethanol gewaschen und eine mFISH-Färbung nach Abschnitt 2.3.3.7 durchgeführt. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der mFISH-Färbung wurden die Metaphasen der Telomer-FISH-Färbung über die Software relokalisiert und nach Abschnitt 2.3.3.11 ausgewertet.

### 2.3.3.10 Interphase-Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Interphase-FISH)

Die Interphase-FISH-Methode wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung von Aneuploidien, d.h. dem Zugewinn oder Verlust spezifischer Chromosomen in Interphase-Zellkernen durchgeführt. Die Hybridisierungen wurden mit einer gegen das Chromosom von Interesse gerichteten kurzen alpha-Satelliten-DNA-Sonde (Abbott Molecular, Anhang A.5) durchgeführt. Sämtliche Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte von auf Objektträgern fixierten Zellkernen und Chromosomen wurden nach dem AneuVysion® Multicolor DNA Probe Kit-Protokoll (Abbott Molecular, Anhang A.1) durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden in 50 ml Coplin-Färbetrögen und, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Objektträger wurden für 5 min in einer auf 73°C vorgewärmten Denaturierungs-Lösung (Anhang A.2.2) denaturiert. Anschließend wurde der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70, 80 und 100 % Ethanol für jeweils eine min gewaschen und dehydriert. Nach kurzem Trocknen an der Luft, wurden zentriert 10 µl der gebrauchsfertigen alpha-Satelliten-DNA-Sonde aufgetragen, mit einem 22 mm x 22 mm Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Für die Hybridisierung wurde der Objektträger für 24 h bei 37°C und feuchter Atmosphäre inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas vorsichtig vom Objektträger entfernt und nicht oder unspezifisch gebundene Sonde durch 30-minütiges Waschen bei 73°C in einer ersten Wasch-Lösung I (Anhang A.2.2) entfernt. Nach einem weiteren Waschschrift für eine min in einer weiteren Wasch-Lösung II (Anhang A.2.2) wurde der Objektträger an der Luft getrock-

## 2. Material und Methoden

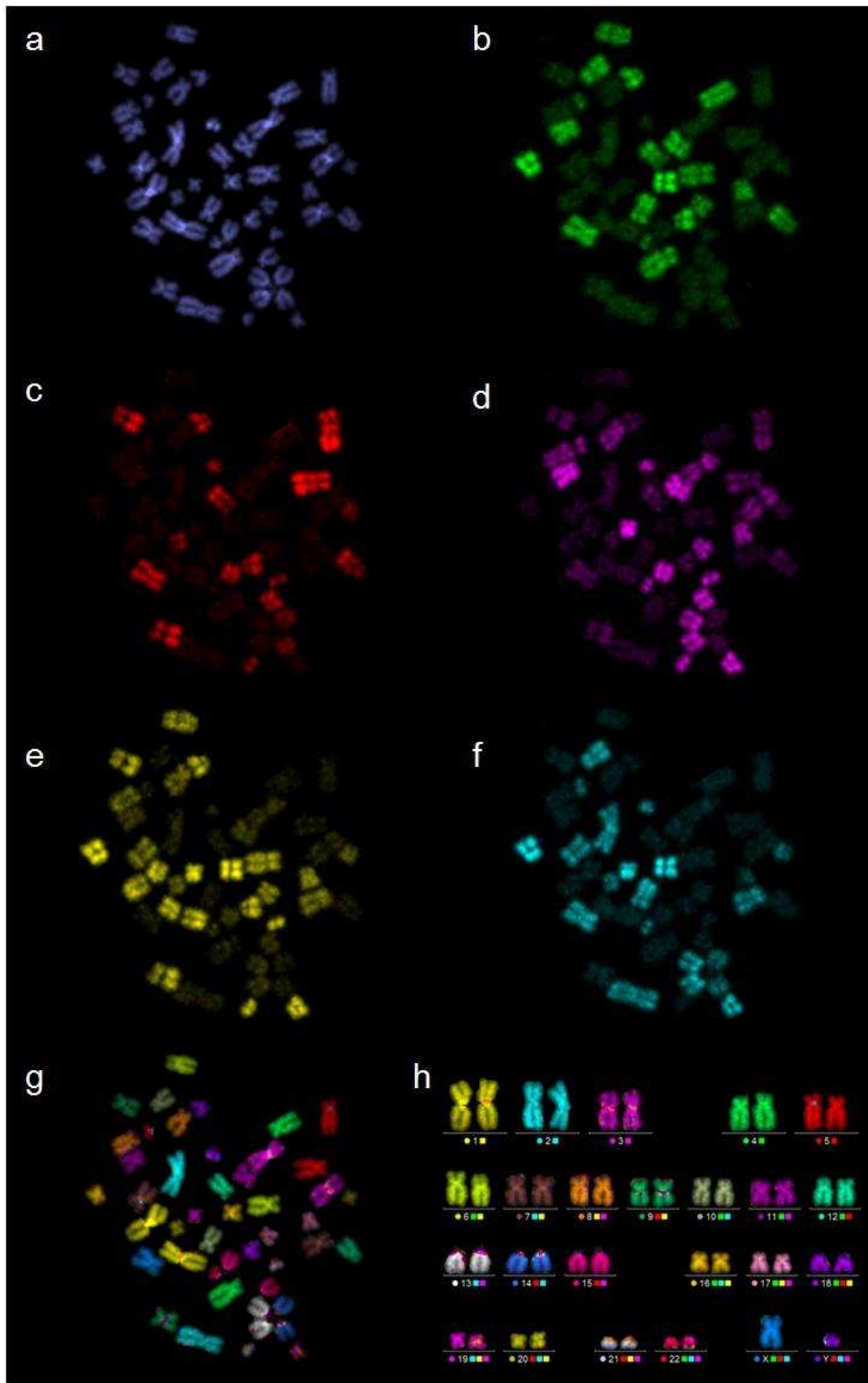
net und es folgte die Gegenfärbung mit 20 µl DAPI/Antifade-Lösung (B-tect, Anhang A.1). Auf den so präparierten Objektträger wurde ein 22 x 40 mm Deckglas aufgelegt und mit wenig Fixogum am Objektträger fixiert. Die Präparate wurden in diesem Zustand bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden nach Abschnitt 2.3.3.11 angefertigt und die Anzahl der chromosomenspezifischen Fluoreszenzsignale pro Zellkern bestimmt.

### **2.3.3.11 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Bearbeitung hybridisierter Metaphasen**

Zur Auswertung der mFISH, mBAND und Telomer-FISH gefärbten Metaphasen wurden an einem motorisierten und computergesteuerten Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61, Olympus) mit einer monochromen CCD-Kamera Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurden die Metaphasen bei 1000-facher Vergrößerung im DAPI-Kanal manuell gesucht und aufgenommen. Die Schritte nach dem Finden einer Metaphase wurden von der Isis Software (In Situ Imaging Systems, Heidelberg) unterstützt. Der Filterwechsel erfolgte automatisch und die Expositionszeiten wurden von einer Integrationsautomatik der Software gesteuert. Die Positionen der Metaphasen auf dem Objektträger wurden automatisch für eine Relokalisierung von der Software gespeichert.

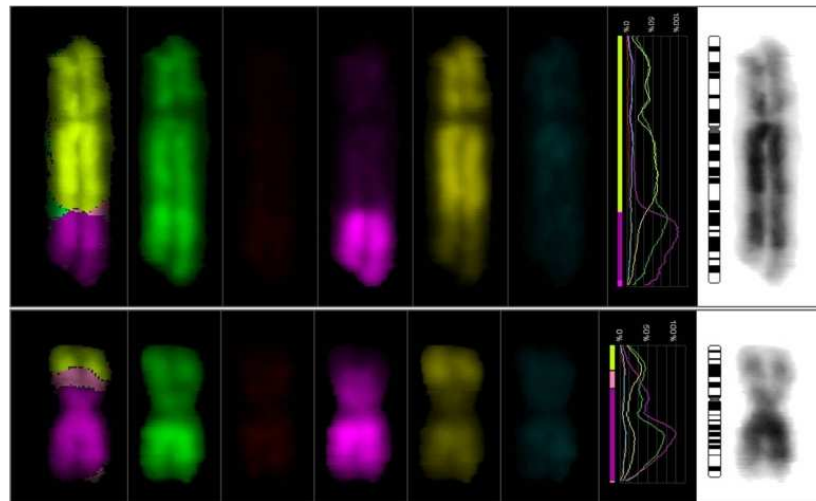
Nach der Aufnahme aller benötigten Farbkanäle wurden diese zu einem Bild überlagert und jedes Fluorochrom in seiner zugewiesenen Darstellungsfarbe in voller Auflösung angezeigt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mFISH-gefärbten Metaphase aller Fluoreszenzkanäle und die Metaphase im kombinatorischen Falschfarbenmodus sowie karyotypisiert sind in Abbildung 2.7 dargestellt.



**Abbildung 2.7:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer mFISH-gefärbten Metaphase. Dargestellt sind die Aufnahmen der Fluoreszenzemissionen von (a) DAPI ( $\lambda_{em}$  455 nm), (b) FITC ( $\lambda_{em}$  521 nm), (c) Spectrum Orange™ ( $\lambda_{em}$  588 nm), (d) Texas Red® ( $\lambda_{em}$  615 nm), (e) Cy™5 ( $\lambda_{em}$  670 nm) und (f) DEAC ( $\lambda_{em}$  480 nm). (g) Metaphase im kombinatorischen Flaschenfarbenmodus und (h) karyotypisiert.

## 2. Material und Methoden

Jedes hybridisierte Chromosom wurde einzeln mittels der sogenannten „Fluorochrom-Galerie“ der ISIS-Software analysiert. Dieser Darstellungsmodus zeigt das Chromosom im kombinatorischen Falschfarben-Modus sowie alle der vorhandenen Fluorochrome, deren Intensitätsprofile und ein Graustufenbild der Gegenfärbung. In Abbildung 2.8 ist ein reziproker Austausch chromosomalen Materials (Translokation) mFISH-gefärbter Chromosomen im „Fluorochrom-Galerie“-Modus dargestellt.



**Abbildung 2.8:** Darstellung eines reziproken Austausches chromosomalen Materials (Translokation) mFISH-gefärbter Chromosomen im "Fluorochrom-Galerie"-Modus der ISIS-Software. Die Translokation fand zwischen den Chromosomen 6 und 11, markiert mit den Fluorochromen Cy<sup>TM</sup>5 und FITC bzw. Texas Red<sup>®</sup> und FITC statt. Die „Fluorochrom Galerie“ zeigt (von links nach rechts) das kombinatorische Falschfarbenbild, die auf dem Chromosom detektierten Fluorochrome in der Reihenfolge FITC, Spectrum Orange<sup>TM</sup>, Texas Red<sup>®</sup>, Cy<sup>TM</sup>5 und DEAC sowie die Fluoreszenzintensitätsprofile entlang der Chromosomenachse. Im letzten Quadranten befinden sich ein idealisiertes Ideogramm (G-Banding) sowie ein Graustufenbild der DAPI-Gegenfärbung.

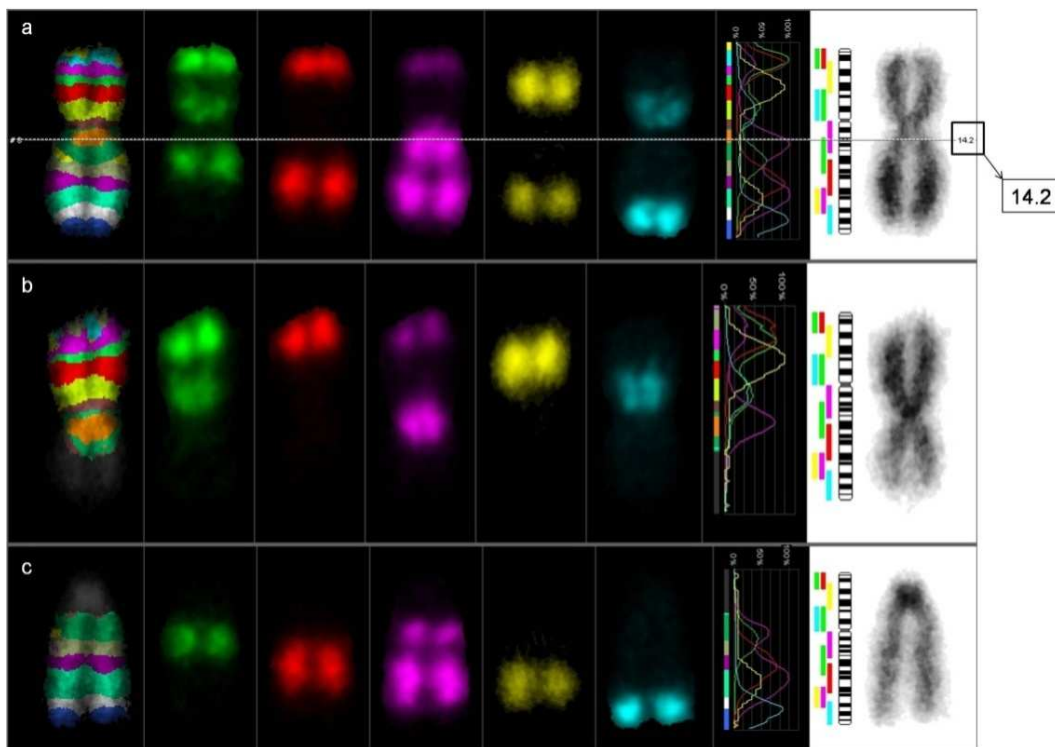
### mBAND-Analysen

mBAND-Hybridierungen werden im Gegensatz zu mFISH-Färbungen jeweils mit Sonden, die nur mit einem Chromosom hybridisieren, durchgeführt. Die Sonden bestehen aus Sequenzen, die zu 9-10 spezifischen Regionen des Chromosoms homolog sind. Diese sind je nach Chromosom mit 3-5 der ebenfalls für die mFISH-Methode verwendeten Fluorochromen (siehe Abschnitt 2.3.3.7) konjugiert. Diese spezifischen, partiellen Färbungen eines Chromosoms erzeugen für jedes Fluorochrom ein graduell vom Zentrum abnehmendes Fluoreszenzintensitätsprofil. Zusätzlich werden die Verhältnisse der überlappenden Intensitätsprofile der einzelnen markierten chromosomalen Fragmente von der ISIS-Software quantifiziert. Daraus werden die spezifischen Falschfarben-Bänderungen generiert. Die Anzahl der Bänder kann manuell beliebig gewählt werden, aber als sinnvolle Anzahl an Bändern erwies sich die 3-fache Anzahl der konjugierten Fluorochrome pro Chromosom, d.h. bei 5 verschiedenen Fluorochromen pro Chromosom.

## 2. Material und Methoden

rochromen pro Chromosom wurde eine Darstellung von etwa 15 Falschfarben-Bändern gewählt.

Die Analyse erfolgte, wie für mFISH-Färbungen, im „Fluorochrom-Galerie“-Modus der ISIS-Software. Chromosomale Veränderungen wurden anhand des direkten Vergleichs der Bänderungsprofile eines aberranten Chromosoms mit dem unveränderten homologen Chromosom in der gleichen Metaphase detektiert. Die als Abweichung der Bänderungsprofile auftretenden Bruchpunkte wurden anhand des von der ISIS-Software vorgegebenen chromosomenspezifischen Ideogramms (G-Banding) auf den chromosomalen Banden lokalisiert (Abbildung 2.9).



**Abbildung 2.9:** Darstellung eines Austausches chromosomalen Materials (Translokation) (b, c) zwischen einem mBAND-gefärbten Chromosom 2 und einem nur mit DAPI gegengefärbten Chromosom im "Fluorochrom-Galerie"-Modus. Für die Falschfarben-Bänderung wurde eine Anzahl von 15 Bändern gewählt. (a) Das unveränderte Chromosom 2 zeigt die zu erwartende Bänderung, anhand der im vorgegebenen Ideogramm der Bruchpunkt des aberranten Chromosoms bestimmt wird. Dieser wurde auf der Bande 2q14.2 lokalisiert.

Für mFISH, mBAND und Telomer-FISH-Analysen wurden 100 Metaphasen pro Probe analysiert. Wurde diese Anzahl an Metaphasen aufgrund eines niedrigen Mitose-Index nicht erreicht, wurden alle vorliegenden Metaphasen eines Präparates ausgewertet.

### 2.3.3.12 Analyse chromosomaler Aberrationen

Chromosomalen Aberrationen wurden für Giemsa-gefärbte Präparate in Anlehnung an Savage (Savage 1976) klassifiziert; für die Beschreibung der Aberrationen in mFISH und mBAND gefärbten Präparaten wurde die an die PAINT-Nomenklatur (Cornforth 2001) angelehnte Nomenklatur von Loucas & Cornforth benutzt (Loucas und Cornforth 2001). Jedes an einer Aberration beteiligte Autosom wurde dabei mit seiner Nummer und Gonosomen mit deren Buchstaben bezeichnet. Eine Verknüpfung von Chromosomen wurde durch einen Bindestrich dargestellt. Chromosomale Fragmente, die das Zentromer enthielten, wurden mit einem Apostroph gekennzeichnet, Fragmente ohne Zentromer (azentrisch, ace) entsprechend ohne Apostroph. Unterschiedliche Aberrationen wurden durch ein Semikolon getrennt. Eine vollständiger reziproker Austausch chromosomalen Materials (Translokation) zwischen den Chromosomen 2 und 16 wurde dieser Nomenklatur folgend als (2'-16) (16'-2) bezeichnet.

Chromosomenbrüche entstehen durch Schädigung der DNA nach Einwirkung von Strahlung oder klastogene Agentien sowie durch Rekombinationseignisse. Brüche, die in der G1-Phase des Zellzyklus auftreten und nicht repariert werden, erscheinen repliziert in der analysierten Metaphase als Chromosomenbrüche, d.h. beide Chromatiden sind betroffen. Brüche, die hingegen in der G2- oder späten S-Phase des Zellzyklus entstehen, betreffen nur eine der Schwesterchromatiden. Grundsätzlich werden vollständige und unvollständige strukturelle Aberrationen unterschieden. Aberrationen sind vollständig, wenn kein Zugewinn oder Verlust von chromosomalem Material stattfindet. Im Falle von unvollständigen Aberrationen kommt es zum Verlust chromosomaler Fragmente (Buselmaier und Tariveridan 1999, Strachan und Read 2005).

Bei der in dieser Arbeit verwendeten mFISH und mBAND-Methode ist zu beachten, dass die zytogenetische Nachweisgrenze der eingesetzten chromosomspezifischen, fluorchromgekoppelten DNA-Sonden bei etwa 2-3 Megabasen liegt (Saracoglu *et al.* 2001), wodurch chromosomale Fragmente mit einer Länge unter dieser Nachweisgrenze nicht detektiert werden.

Die folgenden strukturellen Aberrationstypen wurden bei den Analysen berücksichtigt:

**Dizentrische Chromosomen (dic)** entstehen durch einfache Chromatid- und Chromosomenbrüche und nach Verknüpfung der trunkierten Chromosomen (Abbildung 2.10f). Dabei entstehen zwei azentrische Fragmente der Chromatiden, welche in der Regel reziprok verknüpft werden. Daher werden dizentrische Chromosomen, begleitet von einem azentrischen Fragment und bei Färbung mit nur einem Farbstoff (Giemsa), als eine Aberration gewertet.



## 2. Material und Methoden

Mittels der mFISH-Methode kann dabei zwischen reziproken bzw. vollständigen und unvollständigen azentrischen Fragmenten unterschieden werden.

**Telomerfusionen (tf)** sind Verknüpfungen von Chromosomen durch dysfunktionale Telomere. Sie treten als dizentrische Chromosomen in Erscheinung, die nicht von azentrischen Fragmenten begleitet werden.

Verkürzte Chromosomen werden unabhängig von ihrer Entstehung durch terminale oder interstitielle Deletionen als **trunkiert (T)** bezeichnet.

Die in dieser Arbeit als **Chromosomenbrüche (csb)** bezeichneten Aberrationen treten in Form trunkierter Chromosomen mit oder ohne azentrisches Fragment auf (Abbildung 2.10b).

Die als **zentrischer Ring (R)** (Abbildung 2.10c) oder Ringchromosomen bezeichnete Aberration, beschreibt einen Ring, der ein Zentromer enthält. Dieser entsteht durch jeweils einen Bruch in jedem Arm eines Chromosoms. Die Bruchflächen der terminalen Enden werden verknüpft und ein geschlossener Ring entsteht. Ringchromosomen werden in der Regel von einem azentrischen Fragment begleitet, das durch die Verknüpfung der beiden azentrischen Fragmente entsteht.

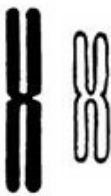



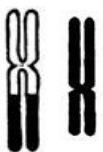

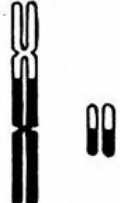
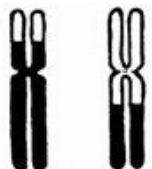
In die Gruppe der **Chromatidtyp-Aberrationen (cta)** fallen die im Folgenden definierten **Chromatidbrüche (ctb)** sowie der **Chromatidtyp-Austausch** (chromatidtype exchange, **cte**). Als Chromatidbrüche (Abbildung 2.10a) werden Brüche gewertet, die nur in einer Schwesterchromatide des Chromosoms auftreten. Die dabei entstehende Lücke muss breiter als das betroffene Chromatid selbst sein. Lücken, die kleiner als der Chromatiddurchmesser sind (gap), werden zwar bei der Analyse erfasst, aber allgemein als achromatische Läsionen und nicht als Aberration gewertet.

Ein Chromatidtyp-Austausch (Abbildung 2.10e) entsteht durch je einen Chromatidbruch in zwei Chromosomen und führt zu symmetrischen oder asymmetrischen Chromatid-Austausch-Konfigurationen. Durch die Position des Zentromers und die daraus resultierende Segregationen der so verknüpften Chromatiden auf die Tochterzellen, können chromosomale Aberrationen, meist dizentrische Chromosomen oder Translokationen, entstehen.

Die folgenden Aberrationen beschreiben interchromosomale Austausche, die im Gegensatz zur Giemsa- mit der mFISH-Methode analysiert werden können. Die zuvor aufgeführten Aberrationen wurden bei mFISH-Analysen aber ebenfalls berücksichtigt. Eine **Translokation (t)** beschreibt einen Austausch oder eine Übertragung eines Chromosomenfragments auf ein anderes Chromosom. Es wird zwischen **reziproken**, d.h. vollständigen (Abbildung 2.10g), und **unvollständigen** Translokationen (Abbildung 2.10d) unterschieden. Im Falle einer reziproken Translokation werden zwei chromosomale Fragmente durch zwei Bruchereignisse ausgetauscht, was nicht zum Verlust von genetischem Material führt. Bei der unvollständigen Translokation hingegen wird nur ein Chromosomenfragment übertragen. Das verbleibende

## 2. Material und Methoden

azentrische Fragment liegt frei in der Metaphase vor oder geht bei den folgenden Zellteilungen verloren.

Normal	Chromatid- bruch (ctb)	Chromosomen- bruch (csb)	Zentrischer Ring mit Fragment (R)	Unvollständige Translokation (t)
	<b>a</b> 	<b>b</b> 	<b>c</b> 	<b>d</b> 
Chromatidtyp-Austausch (cte)		Dizentrisches Chromosom mit azentrischem Fragment (dic)		Reziproke Translokation (t)
<b>e</b> 		<b>f</b> 		<b>g</b> 

**Abbildung 2.10:** Schematische Darstellung verschiedener chromosomaler Aberrationstypen, modifiziert nach Evans (Evans 1974).

Mit Anwendungen der FISH- und vor allem mFISH-Techniken zeigte sich, dass durch Strahlung induzierte strukturelle Aberrationen weitaus komplizierter sind, als es einfarbige Färbemethoden vermuten ließen. Daher wurde in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf diese sogenannten **komplexen Aberrationen** gerichtet. Zu dieser Gruppe gehören Aberrationen, die eine Beteiligung von jeweils mindestens 2 Chromosomen, 2 Armen und 3 Brüchen aufweisen (Savage und Simpson 1994). Jeder komplexe Chromosomenschaden, unabhängig davon wie viele Chromosomen beteiligt waren, wurde als eine Aberration gewertet. Um allerdings die Komplexität dieser Aberrationen zu berücksichtigen, wurden diese nach dem „Chromosomes/Arms/Breaks“-System (C/A/B) nach Savage und Simpson (Savage und Simpson 1994) klassifiziert. Dabei werden jeweils die Anzahl der an der Aberration beteiligten Chromosomen (C), der beteiligten chromosomalen Arme (A) sowie die Anzahl der Brüche (B) angegeben.

In der vorliegenden Arbeit richtete sich ein weiteres Hauptaugenmerk auf **klonale Aberrationen**, die zu einem Analysenzeitpunkt in mindestens zwei Metaphasen eines Chromosomenpräparates detektiert wurden. Diese bestanden in der Regel aus reziproken oder unvollständigen Translokationen, trunkeierten Chromosomen oder komplexen Aberrationen.

## 2. Material und Methoden

### 2.3.4 Proteindetektion von Zellextrakten

#### 2.3.4.1 Herstellung der Zellextrakte

Alle folgenden Arbeitsschritte fanden auf Eis oder in gekühlten Zentrifugen (4 °C) statt und wurden mit Lösungen durchgeführt, die auf 4 °C vorgewärmt waren. Das Kulturmedium wurde entfernt, die Zellen eine Minute mit Trypsin-EDTA überschichtet (~15 µl/cm<sup>2</sup>) und danach mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem 5-fachen Volumen an Kulturmedium verdünnt und in ein vorgekühltes Kunststoff-Zentrifugengefäß überführt. Eventuell im Kulturgefäß verbleibende Zellen wurden durch Zugabe von weiterem Medium aufgenommen und ebenfalls in das Zentrifugengefäß überführt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (107 g, 10 min) wurde der Mediumüberschuss verworfen und die Zellen nach ihrer Resuspendierung in PBS<sup>-/-</sup> aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (107 g, min) wurde der PBS<sup>-/-</sup>-Überstand verworfen und die Zellen mit einem geringen Volumen an PBS<sup>-/-</sup> resuspendiert und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach weiterer Zentrifugation (700 g, 15 min) wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit 50 µl Lysepuffer pro 10<sup>6</sup> Zellen (Anhang A.2.3) überschichtet, vorsichtig durch eine Spritze (1 ml, Kanüle: 0,40 x 12 mm) gezogen und für 30 min lysiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (1,3 x 10<sup>6</sup> g, 15 min), der Überstand in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -20 °C gelagert.

#### 2.3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Zellextrakts erfolgte photometrisch nach dem Bradford-Test (Bradford 1976). Dazu wurde 1 µl des Zellextrakts 1:200 mit Lysepuffer-Verdünnung (1:200 v/v Lysepuffer in Wasser) gemischt. Die Referenzproben wurden aus einer Stammlösung mit 1,4 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) durch Verdünnung mit der Lysepuffer-Verdünnung auf Proteinkonzentrationen von 5, 10, 20 und 40 µg/ml BSA hergestellt. Die Probe- und Referenzverdünnungen wurden 1:5 mit Bradford-Lösung (Roti®Quant, Anhang A.1) in einer Mikrotiterplatte verdünnt und ihre optische Dichte bei 570 nm in einem Lesegerät für Mikrotiterplatten (Bio-Tek, Anhang A.7) gemessen. Die Proteinkonzentration des Zellextrakts wurde anhand der Verdünnung des Proteinextrakts, die auf Verdünnungen von Proteinlösungen mit bekannter Konzentration bezogen wurde, bestimmt.

## 2. Material und Methoden

### 2.3.4.3 Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese

Das der aufzutrennenden Proteinmasse entsprechende Volumen des Proteinextrakts wurde mit dem gleichen Volumen Auftragspuffer (Anhang A.2.3) gemischt und zur Denaturierung der Proteine für 10 min auf mindestens 80°C erhitzt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel (Sammelgel: 3,2 %, Trenngel: 12 %, Anhang A.2.3) aufgetragen und bei 16 mA elektrophoretisch zusammen mit Standardmarkern aufgetrennt. Das Gel befand sich dabei in einem Laufpuffer (Anhang A.2.3). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Western-Blotting weiterbehandelt.

### 2.3.4.4 Proteintransfer mittels Western-Blotting

Das Gel wurde in Transferpuffer (Anhang A.2.3) equilibriert und auf einem Whatman-Papier blasenfrei mit einer Polyvinylidenfluorid-Membran (Anhang A.6) bedeckt, die nacheinander kurz in Methanol, Wasser und Transferpuffer equilibriert worden war. Die Membran wurde mit einem weiteren Whatman-Papier bedeckt, der gesamte Verbund auf die Maße des Gels zurechtgeschnitten und zwischen zwei Schwämmen in die mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Blotting-Apparatur geklemmt. Die Apparatur wurde während des Blottens auf 4°C gekühlt und der Transferpuffer mit einem Magnetrührer zirkuliert. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V wurden die Proteine elektrophoretisch aus dem Gel auf die Membran übertragen. Bei einer resultierenden Stromstärke von ca. 400 mA wurde eine Blotzeit von 2 h gewählt.

### 2.3.4.5 Immundetektion

Die Membran wurde vom Gel abgehoben, für 10 min in Tris-gepufferte-Saline-Tween-20-Lösung (TBST, Anhang A.2.3) gespült und unspezifische Bindungsstellen für mindestens 1 h in Blocking-Lösung (Anhang A.2.3) abgesättigt. Um Proteine unterschiedlicher Größe gleichzeitig detektieren zu können, wurde die Membran senkrecht zur Laufrichtung bei den entsprechenden Markerpositionen durchgeschnitten. Anschließend wurden die Membranstücke auf der vormalig dem Gel zugewandten Seite mit verdünntem Primär-Antikörper (Antikörper in Blocking-Lösung) überschichtet. Nach mindestens 3 h Inkubation wurden die Membranstücke drei Mal für 10 min in TBST-Waschpuffer gespült. Anschließend wurden die Membranstücke mit der Verdünnung eines Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundär-Antikörpers überschichtet und für eine Stunde inkubiert und zuletzt sechs Mal für 10 min in TBST-Waschpuffer gespült. Die bei der Detektion verwendeten Primär- und Sekundär-

## 2. Material und Methoden

Antikörper und deren Konzentrationen sind im Anhang A.4 aufgeführt. Nach der Immundetektion wurden die Membranen für 10 min mit einer Chemolumineszenz-Substratlösung equilibriert (ECL, Anhang A.1), nach Entfernen der überschüssigen Substratlösung in eine Polyethylenfolie eingeschweißt und in eine Filmkassette eingeklebt. Das bei der Chemolumineszenz emittierte Licht wurde mit Filmen für die Autoradiographie (Hyperfilm ECL, Anhang A.6) detektiert.

Die exponierten Filme wurden in einer Entwicklermaschine für Röntgenfilme (AGFA) entwickelt. Wenn eine weitere Immundetektion auf der Membran durchgeführt werden sollte, wurde die Membran zuerst für 10 min in TBST Waschpuffer gespült. Zur Entfernung der bereits gebundenen Antikörper wurde die Membran anschließend in einem "Stripping"-Puffer gewaschen (20-30 min, 50 °C, Anhang A.2.3). Die Immundetektion wurde danach mit den nach dem Blotten folgenden Schritten fortgesetzt.

### 2.3.5 Proteindetektion mittels der In Cell Western-Methode

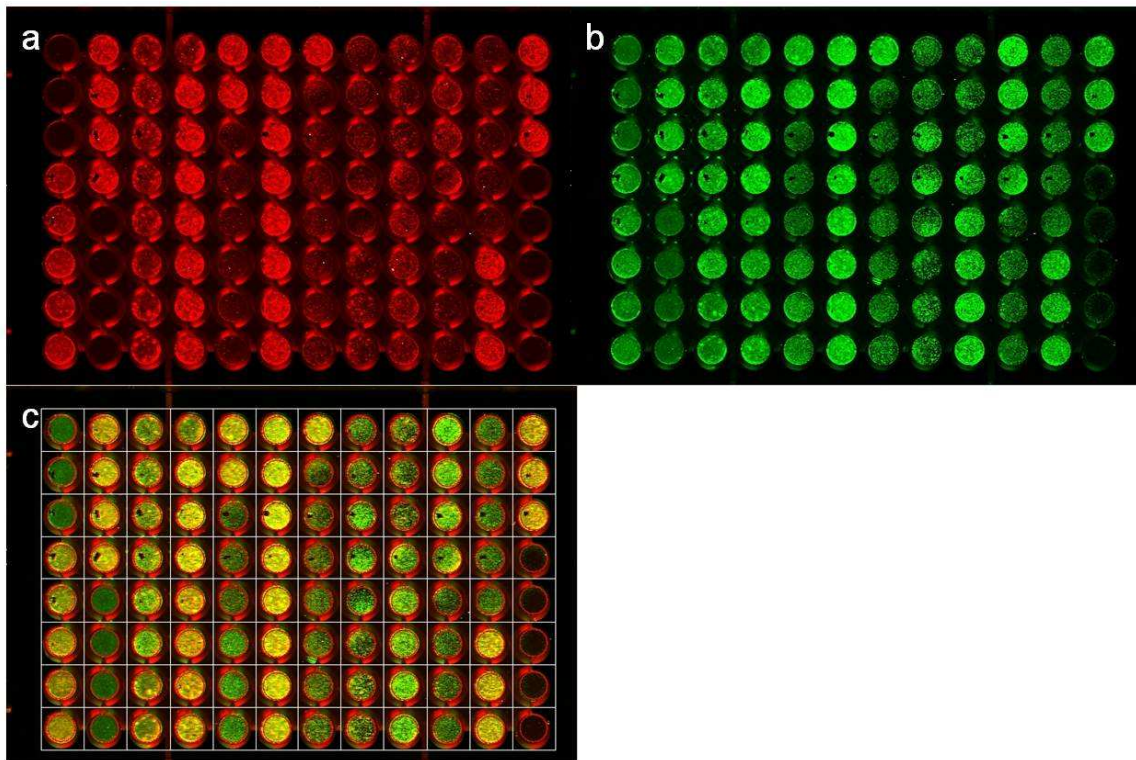
Als eine Methode der intrazellulären Proteindetektion wurde der sogenannte „In Cell Western“ (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) verwendet, der auf dem Prinzip der sekundären Immunfluoreszenz basiert. Diese Methode bietet den Vorteil der Quantifizierung intrazellulärer Proteinmengen bei niedrigen Zellzahlen ( $\geq 10^4$  Zellen), was mittels der Western-Blot-Methode ( $\geq 10^5$  Zellen) nicht möglich war.

Für den In Cell Western wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit in Mikrotiterplatten mit 96 Kammern kultiviert, in denen ebenfalls die Messung erfolgte. Es wurde jeweils eine Einsaat von  $5-10 \times 10^3$  Zellen pro Kammer vorgenommen und alle Proben wurden in Triplikaten eingesät. Die Zellen wurden maximal für 7 Tage in den Mikrotiterplatten kultiviert, um einen mindestens zu 60-70 % konfluenten Zellrasen zu bilden, der für eine zuverlässige Messung bei dieser Methode notwendig ist. Alle der folgenden Schritte wurden, falls nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln der Mikrotiterplatte durchgeführt. Alle Volumenangaben beziehen sich jeweils auf eine der 96 Kammern einer Mikrotiterplatte.

Für eine Fixierung der Zellen wurde der Mediumüberstand abgezogen und die Zellen mit 150 µl Fixierlösung (Anhang A.2.3) für 20 min überschichtet. Anschließend wurden die Zellen 5 x mit 200 µl einer Triton-Waschlösung (Anhang A.2.3) für jeweils 5 min permeabilisiert. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden nach dem permeabilisieren der Zellen mit 150 µl Blockierungs-Reagenz (Odyssey Blockig Buffer, Anhang A.1) für mindestens 1,5 h abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem jeweils in 50 µl Blockierungs-Reagenz verdünnten Primär-Antikörper, der gegen das Protein von Interesse gerichtet war, für mindestens 2,5 h oder über Nacht bei 4°C. Die verwendeten Primär-Antikörper sowie deren Konzentrationen sind in Anhang A.4 angegeben. Es wurden jeweils Kontrollzellen mit-

## 2. Material und Methoden

geführt, die nur mit dem Sekundär-Antikörper behandelt wurden. Diese wurden für diese Zeit weiterhin mit dem Blockierungs-Reagenz inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 5 x mit jeweils 200µl einer Tween-Waschlösung (Anhang A.2.3) für 5 min gewaschen. Die folgenden Arbeitsschritte fanden alle unter Lichtausschluss statt. Der Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper (IRDye 800CW, Anhang A.1) wurde in einer Verdünnung von 1:800 dem Blockierungs-Reagenz mit 0,2 % Tween-20 zugesetzt. Zusätzlich wurden die Farbstoffe DRAQ5 (1:2000, Anhang A.1) und Sapphire700 (1:1000; Anhang A.1) zu der Sekundär-Antikörper-Lösung gegeben. Diese Farbstoffe dienen der Normierung der Fluoreszenzsignale der detektierten Proteine auf die Zellzahl pro Kammer. Sapphire700 ist ein unspezifischer Farbstoff, der in toten Zellen zytoplasmatisch und nukleär akkumuliert, während DRAQ5 einen interkalierenden Lebendfarbstoff darstellt. Bis auf Kontrollzellen, die nur mit der Sekundär-Antikörper-Lösung behandelt wurden, wurden alle Zellen mit 50 µl dieser Lösung überschichtet und für eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden 5 x mit jeweils 200µl der Tween-Waschlösung für 5 min gewaschen und vor der Messung wurden die Flüssigkeitsreste vollständig entfernt. Die Messung erfolgte mittels des Odyssey Infrared Imaging Systems (Anhang A.7). Dafür wurde die Mikrotiterplatte auf der Scanner-Oberfläche des Gerätes platziert. Die Anregung der Fluorochrome erfolgt über zwei Dioden Laser im Infrarot-Bereich bei 685 und 785 nm. Die Detektion der Fluoreszenzemission erfolgt ebenfalls in zwei Kanälen bei 700 und 800 nm. Dabei stellt die Emission bei 700 nm das Signal der DRAQ5- und Sapphire700-Farbstoffe zur Normierung der Zellzahl und die Fluoreszenzemission bei 800 nm das Signal des fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörpers und damit des Proteins von Interesse dar. Beide Signale wurden getrennt über eine Maske für jede Kammer der Mikrotiterplatte quantifiziert. Ein repräsentatives Ergebnis eines „In Cell Western“ ist in Abbildung 2.11 dargestellt.



**Abbildung 2.11:** Repräsentativer „In Cell Western“ der vorliegenden Arbeit in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kammern. (a) Mit den Farbstoffen „DRAQ5“ und „Sapphire700“ gefärbte Zellen zur Normierung der Zellzahl pro Kammer ( $\lambda_{em}$  700 nm, rot dargestellt). (b) Proteine von Interesse, detektiert mit spezifischen Primär-Antikörpern und einem Fluororchrom-konjugierten Sekundär-Antikörper (IR-Dye800CW,  $\lambda_{em}$  800 nm, grün dargestellt). (c) Überlagerte Signale aus (a) und (b) mit einem Raster zur Quantifizierung der Fluoreszenzsignale der einzelnen Kammern. Die Kanäle wurden jeweils einzeln quantifiziert.

Für die Auswertung der Daten wurde der Leerwert jeder Messung von Zellen, die nur mit dem Sekundär-Antikörper behandelt wurden, erhalten. Dieser Wert der relativen Fluoreszenzintensität wurde als unspezifisches Hintergrundsignal von der relativen Fluoreszenzintensität der Proben abgezogen. Für die Normierung des Fluoreszenzsignals des Proteins von Interesse auf die Zellzahl pro Kammer wurde der Quotient der relativen Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle (800 nm/700 nm) gebildet. In der vorliegenden Arbeit wurden die relativen Fluoreszenzsignale aller Proben auf die junger konfluenter Zellen bezogen.

### 2.4 Statistische Analyse der Daten

Die Standardabweichung (S) für die prozentuale Bestimmung des Mitose-Index und strukturell oder numerisch aberranter Zellen wurde mittels der Varianz einer Binominalverteilung aus der Anzahl der ausgewerteten Zellen bzw. Metaphasen (N) und der Anzahl der Mitosen, bzw. aberranten Metaphasen ( $N_A$ ) nach Formel 2.2 berechnet.

## 2. Material und Methoden

$$S = \frac{\sqrt{N \times \left( \frac{N}{N_A} \right) \times \left( 1 - \frac{N}{N_A} \right)}}{N} \quad (2.2)$$

Die Standardabweichung (s) für die Anzahl der Aberrationen wurde nach Formel 2.3 aus der Varianz der Anzahl der Aberrationen ( $N_A$ ) und der Anzahl der ausgewerteten Zellen bzw. Metaphasen (N) berechnet.

$$S = \sqrt{\frac{\left( \frac{N_A}{N} \right)}{N}} \quad (2.3)$$



## 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Langzeitentwicklung von normalen humanen Fibroblasten bis zum Erreichen der sogenannten replikativen Seneszenz und darüber hinaus untersucht. Dies geschah zunächst ohne jegliche Einwirkung genotoxischer Agentien und wurde anschließend mit dem Einfluss einer Bestrahlung mit ionisierender Strahlung verglichen. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf zytogenetische Veränderungen, die Expression zellzyklusregulierender Proteine sowie eine intrazelluläre Akkumulation von ROS in den Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen. Neben Untersuchungen bestrahlter Massenkulturen von Fibroblasten hinsichtlich einer intrazellulären ROS-Akkumulation in Tagen nach Bestrahlung, wurde ebenfalls die Langzeitentwicklung der direkten Nachkommen mit Röntgenstrahlung und einer definierten Anzahl Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] gezielt bestrahlter Einzelzellen in Kolonien betrachtet.

Fibroblasten zeigen *in vitro* nur eine zeitlich begrenzte replikative Lebensspanne (Hayflick und Moorhead 1961), die mit dem Erreichen eines irreversiblen Zellzyklusarrestes, der replikativen Seneszenz endet. Dabei durchlaufen Fibroblasten unterschiedliche morphologische Differenzierungsstadien (Bayreuther *et al.* 1988). Eine frühzeitige Differenzierung, bzw. ein transienter oder terminaler Zellzyklusarrest, kann durch die Einwirkung ionisierender Strahlung hervorgerufen werden (Herskind und Rodemann 2000, Rodemann *et al.* 1991, Di Leonardo *et al.* 1994). Die replikative Seneszenz wird in direktem Zusammenhang mit erhöhten intrazellulären Mengen von ROS gebracht (Droege 2002, Harman 1956), deren Akkumulation in Fibroblasten direkt nach Bestrahlung mit dünn- sowie dicht-ionisierender Strahlung bereits gezeigt werden konnte (Rugo und Schiestl 2004, Colindres 2008). Ebenso stehen persistent erhöhte zelluläre ROS-Mengen in Verbindung mit einer genomischen Instabilität (Clutton *et al.* 1996, Limoli *et al.* 1997). Eine genomische Instabilität wurde bereits in Nachkommen bestrahlter Fibroblasten nach Einwirkung von dünn- und dicht-ionisierender Strahlung beobachtet (Fournier *et al.* 2007, Kadhim *et al.* 1998, Martins *et al.* 1993), wobei ebenfalls kontroverse Ergebnisse diesbezüglich vorliegen (Dugan und Bedford 2003). Daher wurde die zytogenetische Entwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten einerseits in Kolonien und andererseits in Massenkulturen untersucht. Für eine Bestrahlung der Zellen mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] wurde die Mikrosonde der GSI genutzt, die eine gezielte Bestrahlung von Zellen mit einer definierten Anzahl an Ionen ermöglicht und damit eine makroskopisch inhomogene Schadensverteilung verhindert (siehe Abschnitt 2.2.4). Fibroblasten zeigen mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz eine charakteristische Expression zellzyklusregulierender Proteine (Übersicht in: (Ben-Porath und Weinberg 2005)). Da in Nachkommen mit einer hohen Dosis Röntgenstrahlung bestrahlter Fibroblasten (16 Gy) einherge-

### 3. Ergebnisse

hend mit genomischer Instabilität bereits eine veränderte Proteinexpression beobachtet wurde (Fournier *et al.* 2007), wurde diese ebenfalls untersucht.

Es werden zuerst die Ergebnisse der Langzeitkultivierungen verschiedener nicht bestrahlter Fibroblastenlinien vorgestellt (Abschnitt 3.1). Im Anschluss wird die genomische Stabilität der Nachkommen mit dünn- und dicht-ionisierender Strahlung bestrahlten Fibroblasten beschrieben (Abschnitt 3.2) und abschließend die Untersuchung einer strahleninduzierten ROS-Akkumulation in Fibroblasten und deren Nachkommen (Abschnitt 3.3).

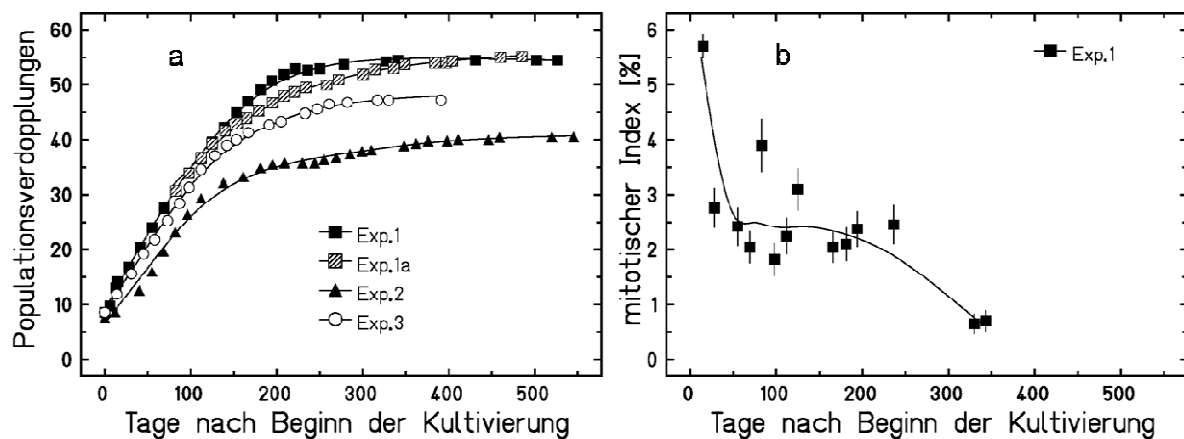
### 3.1 Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

Es wurden zytogenetische Untersuchungen in drei normalen humanen Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90, AG1522D) aus drei unterschiedlichen Ursprungsgeweben (Haut, Lunge, Vorhaut) durchgeführt, die in wiederholten Experimenten *in vitro* bis zum Erreichen der replikativen Seneszenz und darüber hinaus kultiviert wurden. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf strukturelle und numerische chromosomale Veränderungen über die gesamte Kultivierungsdauer ohne vorherige Einwirkung ionisierender Strahlung und damit eine Charakterisierung der Fibroblastenlinien für spätere Strahlungsexperimente. Es sollte damit zusätzlich eine Variabilität zwischen den Linien, Experimenten und Ursprungsgeweben untersucht werden. In zwei der Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90) kam es in wiederholten Experimenten zur Akkumulation von instabilen chromosomalen Aberrationen. Es zeigte sich in diesen Fibroblastenlinien ebenfalls eine starke Expansion von Zellen mit klonalen strukturellen und numerischen Aberrationen. Im Zuge der Expansion von Zellen mit diesen zytogenetischen Veränderungen wurde für eine Fibroblastenlinie (NHDF) in einem Experiment eine deutlich höhere Proliferationsaktivität als in den Vergleichsexperimenten festgestellt. In diesem Zusammenhang wurden daher zusätzlich die Expression zellzyklusrelevanter Proteine und eine Akkumulation von ROS, die im Zusammenhang mit der Alterung von Zellen und genomischer Instabilität stehen, in allen Fibroblastenlinien untersucht.

### 3.1.1 Langzeitentwicklung von NHDF-Zellen

#### 3.1.1.1 Proliferation von NHDF-Zellen in Langzeitkulturen

Fibroblasten erreichen nach einer Phase der aktiven Proliferation einen irreversiblen Zellzyklusarrest und damit einen Verlust der Teilungsfähigkeit, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Hayflick und Moorhead 1961). Zur Beschreibung des relativen zellulären Alters wird dabei die Anzahl durchlaufener PDs herangezogen. In Abbildung 3.1a ist das Proliferationsverhalten von NHDF-Zellen in Massenkulturen für drei Experimente (Exp.1/2/3) bis zu einer maximalen Kultivierungsdauer von 550 Tagen gezeigt.



**Abbildung 3.1:** Proliferation von NHDF-Zellen drei unabhängiger Experimente (Exp.1/2/3). (a) Zunahme der PDs und (b) exemplarische Entwicklung des mitotischen Index von Experiment 1 aus Giemsa-Analysen über die Kultivierungsdauer. Für Exp.1a wurden Zellen aus Exp.1 verwendet, die zu einem mittleren Zeitpunkt der Kultivierung (98 Tage, PD 34) kryokonserviert wurden.

Experiment 1 wurde ab einem mittleren Kultivierungszeitpunkt (PD 31, 80 Tage) unter Verwendung kryokonservierter Zellen als Experiment 1a wiederholt. Die Experimente 1, 2 und 3 wurden mit „jungen“ NHDF-Zellen (9 PDs) gestartet. Die durchlaufenen PDs sowie die Tage nach Beginn der Kultivierung beim Erreichen der replikativen Seneszenz, d.h. dem Zeitpunkt, ab dem keine Zunahme von PDs mehr beobachtet wurde, sind für alle Experimente in Tabelle 3.1 zusammengefasst. NHDF-Zellen zeigten während der Kultivierung in Experiment 1 eine 180 Tage andauernden ersten Wachstumsphase, gefolgt von einer Reduzierung der Steigung der „Proliferationskurve“. Die replikative Seneszenz wurde trotz stetiger Abnahme der Steigung erst nach einer Kultivierungsdauer von 330 Tagen und insgesamt 54 PDs erreicht. Diese Entwicklung kann auch am mitotischen Index für Experiment 1 in Abbildung 3.1b abgelesen werden. Kurz nach Beginn der Kultivierung wurde der höchste mitotische Index von 5,7 % beobachtet. Dieser verringerte sich während der ersten Wachstumsphase im Mittel auf 2,7 % ( $\pm 0,7$ ) und ging mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz auf 0,7 %

( $\pm 0,03$ ) zurück. Eine Kryokonservierung von NHDF-Zellen aus Experiment 1 hatte keine Auswirkung auf die Proliferationsaktivität der Zellen in Experiment 1a.

In Experiment 2 kam es bereits nach einer Kultivierungsdauer von 100 Tagen zu einer stark verringerten Zunahme von PDs. Allerdings hielt eine schwache Proliferationsaktivität bis zu 500 Tage nach Beginn der Kultivierung an. Da es durch diese nur sehr schwache Proliferationsaktivität zu keiner meßbaren Zunahme an PDs mehr kam, wurde der Zeitpunkt der replikativen Seneszenz nach 360 Tagen mit 39 PDs erreicht.

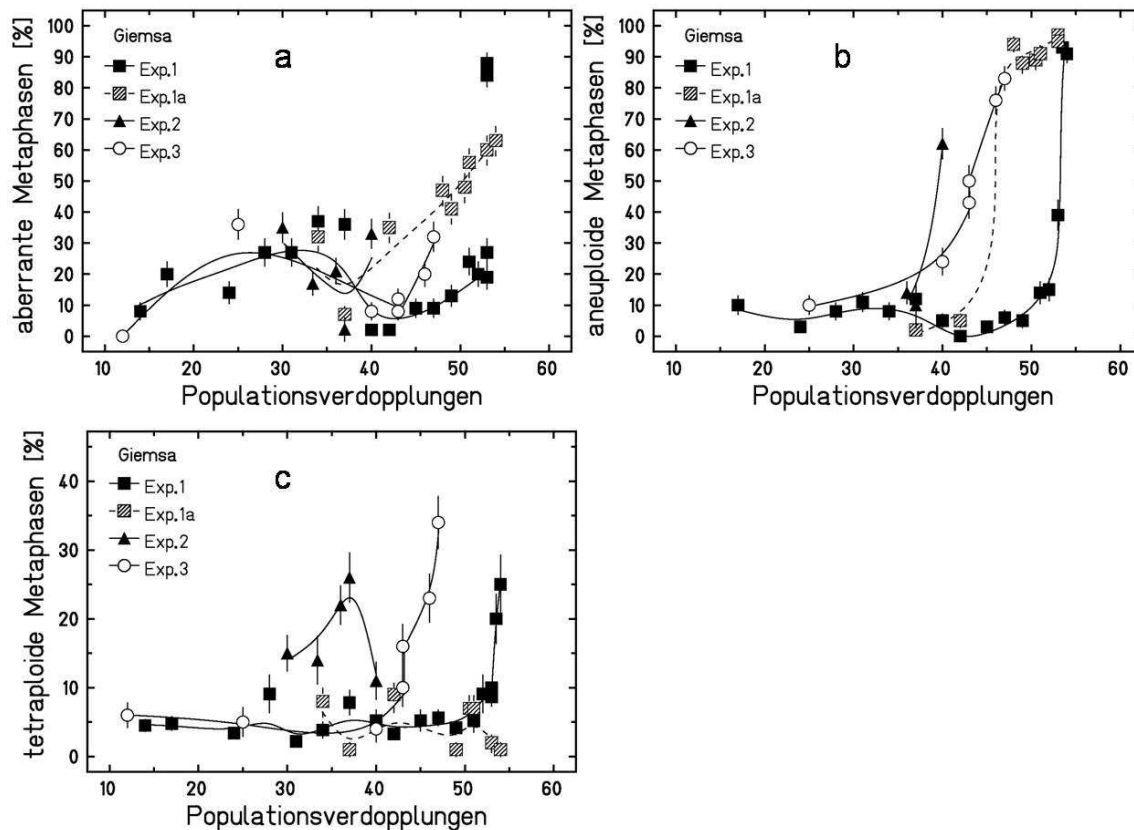
Bei der Durchführung eines weiteren Experiments 3 wurde nach einer ersten proliferationsaktiven Phase von 120 Tagen nur noch eine schwache Zunahme an PDs bis 260 Tage nach Beginn der Kultivierung beobachtet. Dieser Zeitpunkt stellte auch den Eintritt in die replikative Seneszenz dar. Es wurden in diesem Experiment maximal 46 PDs erreicht.

**Tabelle 3.1:** Maximal erreichte PDs und Tage nach Beginn der Kultivierung zum Zeitpunkt des Einsetzens der replikativen Seneszenz in NHDF-Zellen. Replikative Seneszenz wurde definiert als der Kultivierungszeitpunkt, ab dem keine Zunahme von PDs mehr beobachtet wurde.

Experiment/Erreichen der Seneszenz	Exp.1	Exp.1a	Exp.2	Exp.3
Maximal erreichte PDs	54	55	39	46
Tage nach Beginn der Kultivierung	327	460	360	260

### 3.1.1.2 Zytogenetische Langzeitentwicklung von NHDF-Zellen

Für alle Experimente mit NHDF-Zellen wurden in regelmäßigen Abständen der Kultivierung Chromosomenpräparate angefertigt. Alle Präparate wurden mittels der Giemsa-Methode und ausgewählte Zeitpunkte der Kultivierung mit der mFISH-Methode analysiert. Falls von Interesse, wurde ein engerer zeitlicher Abstand für die mFISH-Analysenzeitpunkte gewählt, was für Experiment 1 der Fall war. In Abbildung 3.2a ist die Entwicklung der Anteile aberranter Metaphasen aus Giemsa-Analysen über die Kultivierungsdauer dargestellt.



**Abbildung 3.2:** Zytogenetische Veränderungen in NHDF-Zellen mit zunehmenden PDs aus Giemsa-Analysen. Entwicklung der Anteile (a) aberranter, (b) aneuploider und (c) tetraploider Metaphasen.

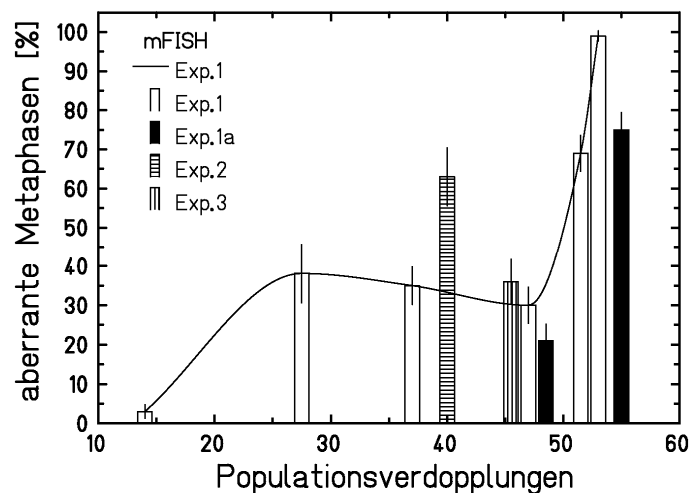
Für die Experimente 1a und 2 lagen Chromosomenpräparate erst zu späteren Zeitpunkten der Kultivierung vor. Wie in Abbildung 3.2a dargestellt, wurden zu Beginn der Kultivierung in Experiment 1 ein niedriger Anteil von 8 % und in Experiment 3 keine aberranten Metaphasen detektiert. Für alle durchgeführten Experimente konnte bereits zu mittleren Zeitpunkten der Kultivierung bei 25 bis 35 durchlaufenen PDs ein deutlicher Anstieg der Anteile aberranter Metaphasen (bis zu 40 %) festgestellt werden. Der hier in allen Experimenten häufigste Aberrationstyp waren Chromatidbrüche sowie Chromatidtyp-Austausche. Der zu Beginn der Kultivierung beobachtete niedrige Anteil aberranter Metaphasen der Experimente 1 und 3 wurde in allen Experimenten nach 35 bis 40 PDs wieder erreicht. Über den weiteren Kultivierungsverlauf wurde ein Wiederanstieg aberranter Metaphasen mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz in allen Experimenten beobachtet. Dieser war am deutlichsten in den Experimenten 1 und 1a, in denen 88 % bzw. 63 % der Metaphasen strukturelle Aberrationen aufwiesen. In den Experimenten 2 und 3, in denen die Zellen die Proliferation früher als in Experiment 1 und 1a einstellten, wurden nur etwa 30 % aberrante Metaphasen beobachtet. Der zu späten Zeitpunkten der Kultivierung am häufigsten auftretende Aberrationstyp waren für alle Experimente dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Zusätzlich kam es zu Chromosomen- wie auch Chromatidbrüchen.

Die Entwicklung numerischer chromosomaler Aberrationen, d.h. Aneuploidie und Tetraploidie, sind in den Abbildungen 3.2b und c dargestellt. Aneuploidie trat in allen Experimenten als Hypodiploidie, d.h. Chromosomenverluste in zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz auf. In Experiment 1a kam es im Vergleich zu den anderen Experimenten früher und schon während der teilungsaktiven Phase (PD 48, 204 Tage) in 99 % der analysierten Metaphasen zu Chromosomenverlusten. 80 % der analysierten Metaphasen hatten zu diesem Zeitpunkt eine Chromosomenzahl von 45. Zu späteren Zeitpunkten der Kultivierung kam es, wie auch in den anderen Experimenten beobachtet, zum Verlust mehrerer Chromosomen pro Metaphase.

Ein Anstieg der Anteile tetraploider Metaphasen, d.h. Metaphasen mit vierfachem DNA-Gehalt (4N), wurde in den Experimenten 1 und 3 mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz auf 25 %, bzw. 35 % aller Metaphasen beobachtet. In Experiment 2 wurde bereits zum ersten analysierten Zeitpunkt (PD 30) in 15 % aller Metaphasen Tetraploidie festgestellt. Nach einem Anstieg auf 25 % mit dem Erreichen der Seneszenz wurde kurz danach das anfängliche Niveau wieder erreicht.

Eine Zunahme von Metaphasen mit numerischen chromosomalen Aberrationen in NHDF-Zellen wurde damit immer kurz vor bzw. mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz beobachtet.

Die Ergebnisse der mFISH-Analysen für strukturelle chromosomale Aberrationen sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Für Experiment 1 decken die Analysenzeitpunkte die gesamte Kultivierungsdauer ab (PD 14-53, 15-330 Tage). Für das Experiment 1a liegen zwei relativ späte (PD 48, 209 Tage und PD 55, 314 Tage) und für die Experimente 2 (PD 40, 380 Tage) und 3 (PD 46, 250 Tage) späte Analysenzeitpunkte in direkter zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz vor.



**Abbildung 3.3:** Zeitliche Entwicklung der Anteile aberranter Metaphasen in NHDF-Zellen aller Experimente über die Kultivierungsdauer aus mFISH-Analysen.

Die Ergebnisse der mFISH-Analysen der zeitlichen Entwicklung der Anteile aberranter Metaphasen entsprachen den Ergebnissen der Giemsa-Analysen. Kurz nach Beginn der Kultivierung wurde in Experiment 1 nur ein sehr geringer Anteil von strukturell aberranten Metaphasen beobachtet (3 %). Zu einem mittleren Zeitpunkt der Kultivierung (PD 28) wurde eine deutliche Zunahme festgestellt. Mit zunehmender Kultivierungsdauer änderte sich der Anteil nicht deutlich, um mit eintretender Seneszenz auf 98 % der analysierten Metaphasen anzusteigen. Dies ging einher mit einer sehr hohen Aberrationsrate von 3,7 Aberrationen pro Metaphase. Ein deutlicher Anstieg der Anteile von Metaphasen mit strukturellen Aberrationen wurde in allen Experimenten mit NHDF-Zellen mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz beobachtet.

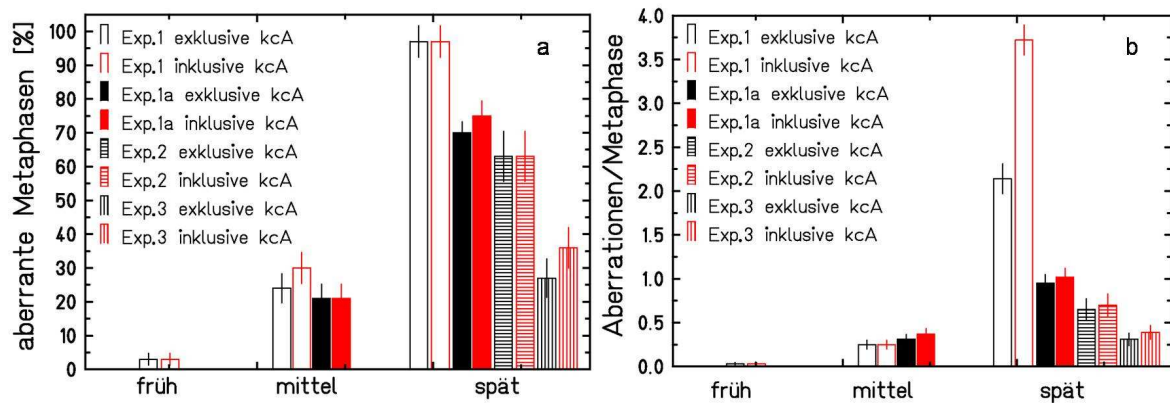
Die zu frühen und mittleren Kultivierungszeitpunkten vorherrschenden Aberrationstypen waren Chromosomen- sowie Chromatidbrüche und Translokationen, die in etwa zu gleichen Teilen vertreten waren. Mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz kam es in allen Experimenten zu einer hohen Anzahl dizentrischer Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Daneben traten auch Chromosomenbrüche und unvollständige, einfache Translokationen auf. Auffällig in den Experimenten 1, 1a und 3 war, dass zu diesen späten Zeitpunkten der Kultivierung komplexe Aberrationen auftraten. Diese kamen in Experiment 1 besonders häufig vor (0,5/Metaphase).

### 3.1.1.2 Klonale Aberrationen in NHDF-Zellen

Eine wichtige Beobachtung in NHDF-Zellen war, dass Aberrationen klonal auftraten, d.h. identische Aberrationen wurden in zwei oder mehr Metaphasen während eines Analysenzeitpunktes detektiert. Teilweise handelte es sich um sehr stark expandierende Subpopulationen (Experiment 1/1a). Für die folgenden mFISH-Analysen struktureller chromosomaler



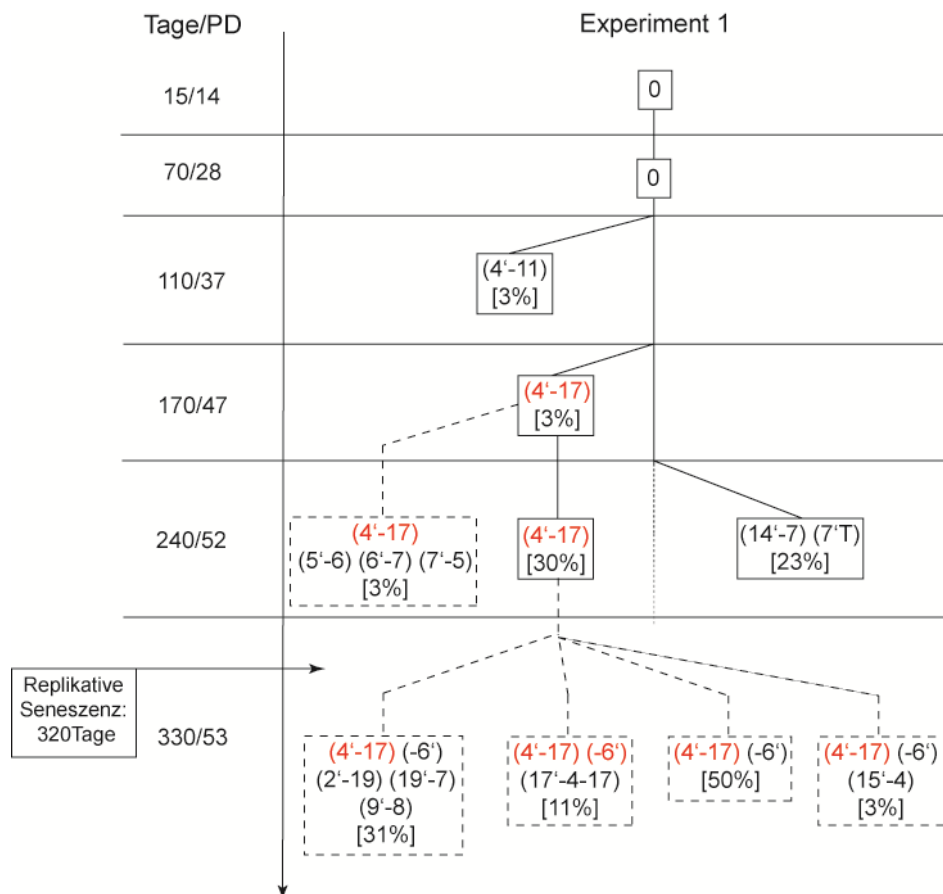
Aberrationen wurden alle aufgetretenen klonalen Aberrationen entweder nur als eine Aberration, unabhängig von deren Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“), oder jede klonale Aberration als eine eigenständige Aberration („inklusive kcA“) und damit mehrfach gewertet.



**Abbildung 3.4:** (a) Anteile aberranter Metaphasen und (b) Aberrationen pro Metaphase aller Experimente mit NHDF-Zellen zu einem frühen (Exp.1; PD 14, 15 Tage), mittleren (Exp.1 und 1a: PD 47, 166 Tage und PD 48, 92 Tage) und späten Kultivierungszeitpunkt (Exp. 1/1a/2/3 Seneszenz, Tabelle 3.1) aus mFISH-Analysen. Alle klonalen chromosomalen Aberrationen (kcA) wurden entweder nur als eine Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“) oder als einzelne, eigenständige Aberration („inklusive kcA“) gewertet.

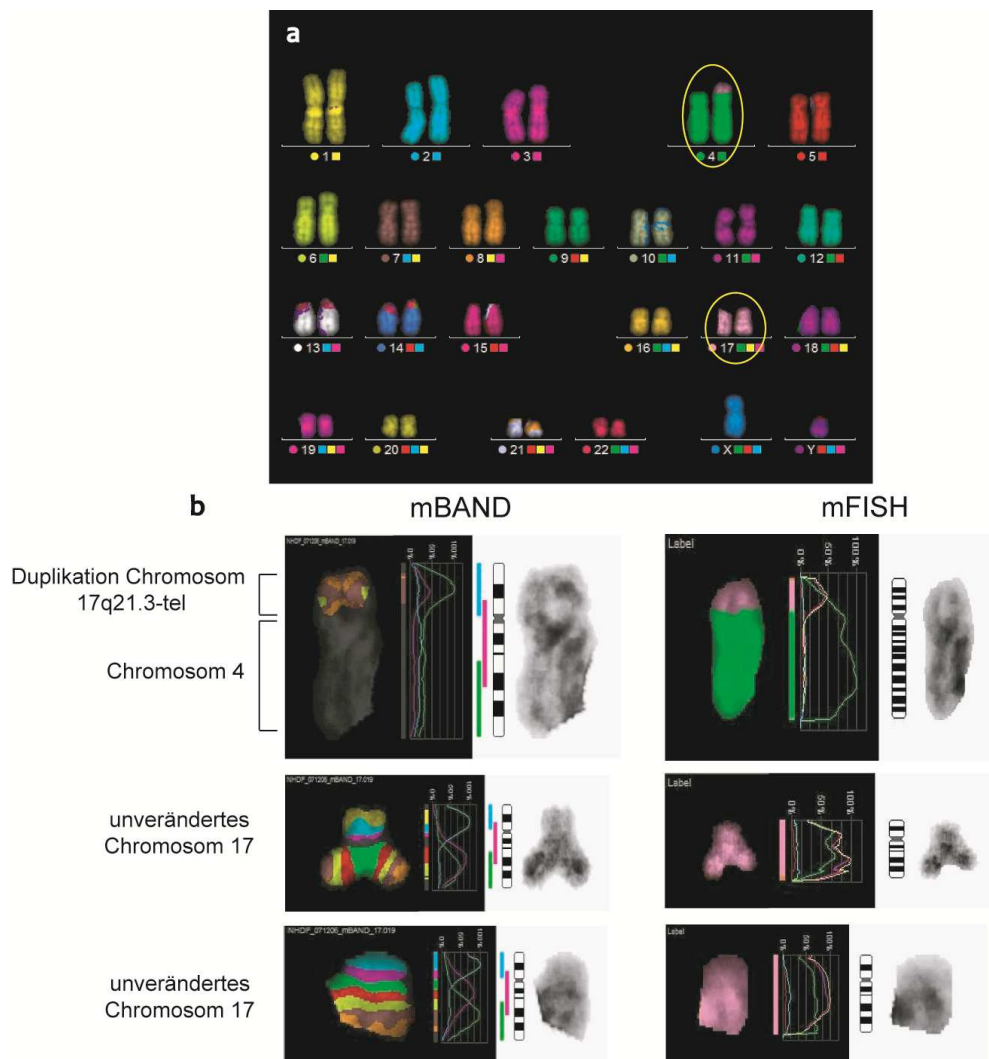
In Abbildung 3.4 sind die Ergebnisse der mFISH-Analysen zu repräsentativen frühen, mittleren und späten Zeitpunkten der Kultivierung dargestellt. Dabei wurden alle klonalen chromosomalen Aberrationen (kcA) entweder nur als eine Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“) oder als einzelne, eigenständige Aberration („inklusive kcA“) gewertet. Wurde die Expansion klonaler Aberrationen berücksichtigt, kam es nur zu einer schwachen Zunahme der Anteile aberranter Metaphasen (Abbildung 3.4a). Dies ist auf eine allgemein sehr hohe Aberrationsrate in NHDF-Zellen zu Kultivierungszeitpunkten zurückzuführen, wodurch zusätzliche sporadische Aberrationen in den Metaphasen mit klonalen Aberrationen auftraten, die in dieser Darstellungsweise bereits als aberrante Metaphasen vertreten sind. Die sehr starke Expansion klonaler Aberrationen in Experiment 1 zeigt sich allerdings bei der Betrachtung der Entwicklung von Aberrationen pro Metaphase über die Kultivierungsdauer in Abbildung 3.4b. Zu einem späten Analysenzeitpunkt kam es hier im Vergleich zu rein sporadischen Aberrationen zu einer zweifach höheren Aberrationsrate pro Zelle, wenn jede klonale Aberration als eine eigenständige Aberration gewertet wurde. In allen anderen Experimenten mit NHDF-Zellen traten zwar klonale strukturelle Aberrationen auf, diese expandierten allerdings nur sehr schwach.

Im folgenden Abschnitt werden die aufgetretenen klonalen Aberrationen näher betrachtet. Die Entwicklung klonaler Aberrationen über die Kultivierungsdauer in Experiment 1 ist in Abbildung 3.5 anhand eines Stammbaums dargestellt.



**Abbildung 3.5:** Stammbaum der Entwicklung klonaler struktureller Aberrationen in NHDF-Zellen aus Experiment 1 über eine Kultivierungsdauer von 330 Tagen. Der prozentuale Anteil von Zellen mit klonalen Aberrationen an allen analysierten Metaphasen des jeweiligen Analysenzeitpunktes ist angegeben.

110 Tage nach Beginn der Kultivierung trat eine einfache, unvollständige Translokation (4'-11) zwischen dem distalen Ende des p-Arms von Chromosom 4 und einem azentrischen Fragment von Chromosom 11 in 3% der analysierten Metaphasen auf. Zum nächsten Analysenzeitpunkt (PD 47, 170 Tage) konnte diese Aberration nicht mehr detektiert werden. Es trat allerdings eine klonale Aberration mit ähnlichem Aberrationsmuster als einfache, unvollständige Translokation (4'-17) zwischen dem Ende des p-Arms von Chromosom 4 und einem azentrischen Fragment von Chromosom 17 in 7 % der analysierten Metaphasen auf. Ein mFISH-gefärbter Karyotyp einer Metaphase mit dieser klonalen Aberration ist in Abbildung 3.6a gezeigt.



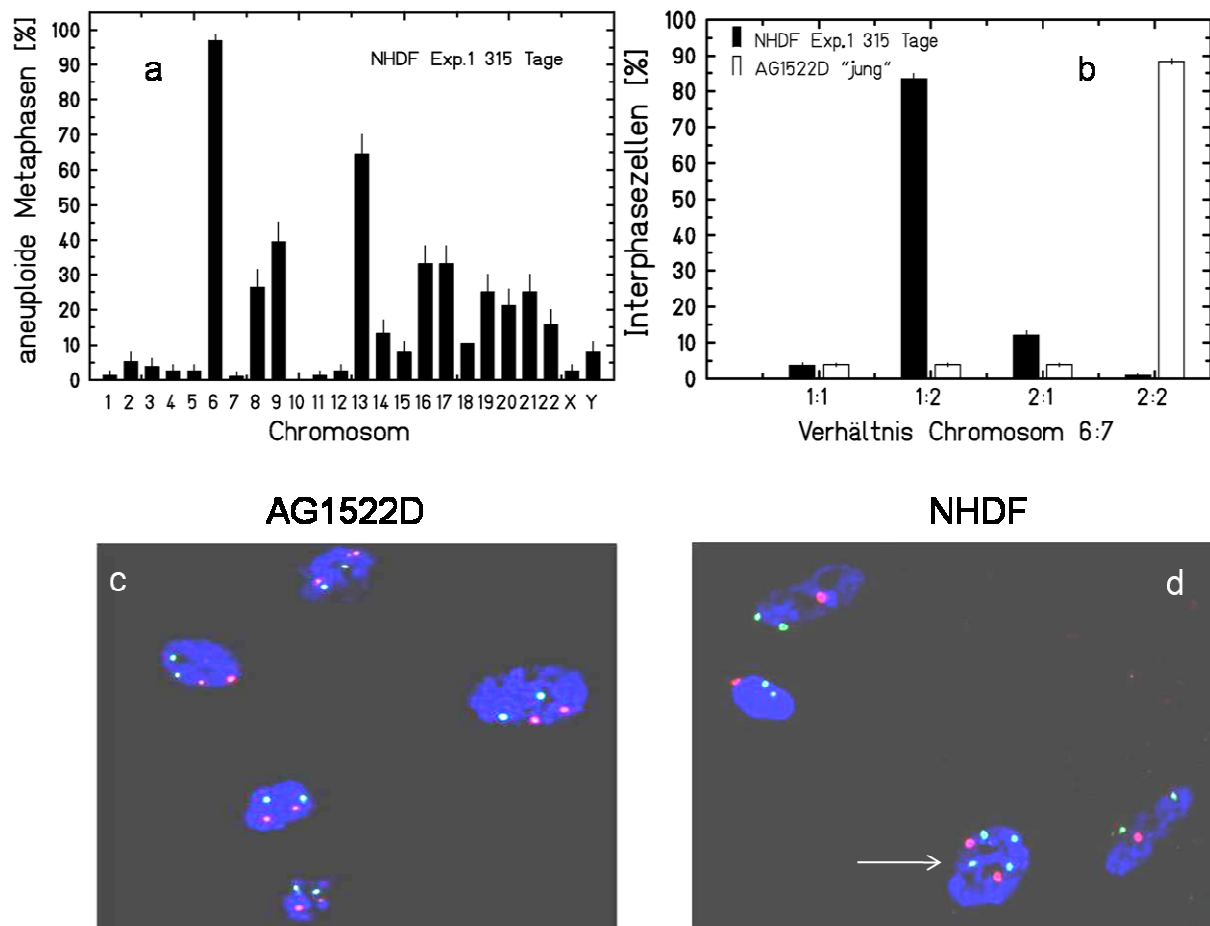
**Abbildung 3.6:** (a) mFISH-gefärbter Karyotyp von NHDF-Zellen aus Experiment 1 mit einer klonalen Translokation (4'-17), aufgetreten 170 Tage nach Beginn der Kultivierung, dargestellt im kombinatorischen Falschfarbenmodus. (b) Sequentiell mBAND- und mFISH-gefärbtes derivatisiertes Chromosom (4'-17) (oben) und beide homologen Chromosomen 17 (unten) aus einer Metaphase. Es wurde die Translokation des duplizierten Fragments 17q21.3-ter eines der homologen Chromosomen 17 am p-Arm von Chromosom 4 festgestellt, da beide der Chromosomen 17 dieser Metaphasen vollständig waren.

Der Ursprung des translozierten azentrischen Fragments vom p- oder q-Arm einer der homologen Chromosomen 17 konnte aufgrund der geringen Größe des Fragments nicht festgestellt werden. Weitere mFISH-Analysen dieses Experiments zu späteren Zeitpunkten (PD 53, 240 Tage) zeigten, dass Zellen mit der klonalen Translokation (4'-17) in der Massenkultur bis auf 30% der analysierten Metaphasen expandierten. Es entwickelte sich ein schwach expandierender Subklon mit der zusätzlichen komplexen Aberration (5'-6) (6'-7) (7'-5). Die Entwicklung von Subklonen deutet auf eine chromosomale Instabilität der Zellen mit der klonalen Translokation (4'-17) hin. Unabhängig davon wurde zu diesem Zeitpunkt eine weitere klonale Translokation ((14'-7) (T7')) in einem relativ hohen Anteil der analysierten Metaphasen detektiert (23 %). Diese konnte zu den später analysierten Zeitpunkten jedoch nicht mehr nachgewiesen werden, während zu diesem Zeitpunkt (PD 53, 330 Tage) allerdings 97

% der analysierten Metaphasen die klonale Translokation (4'-17) zeigten. Eine starke chromosomale Instabilität zu diesem Zeitpunkt äußerte sich durch die Entwicklung diverser und unterschiedlich stark expandierender Subklone in insgesamt 46% der Zellen mit der klonalen Translokation (4'-17) (Abbildung 3.5).

Da ein selektiver Überlebensvorteil und eine verlängerte replikative Lebensspanne der Zellen aus Experiment 1 mit der klonalen Translokation (4'-17) offensichtlich war, wurden mBAND-Analysen mittels einer spezifischen Sonde für Chromosom 17 zu dem spätesten analysierten Zeitpunkt der Kultivierung (PD 53, 330 Tage) durchgeführt, um den chromosomalen Bruchpunkt von Chromosom 17 und genetische Neuordnungen auf diesem Chromosom zu bestimmen, die möglicherweise im Zusammenhang mit einer veränderten Zellzyklusregulierung standen. Dabei konzentrierte sich das Interesse besonders auf das auf diesem Chromosom gelegene Gen für das Tumorsuppressorprotein p53, lokalisiert auf der chromosomalen Bande 17p13.1. Da zu einem späten Analysenzeitpunkt (PD 53, 330 Tage), aufgrund einer hohen chromosomalen Instabilität Chromosom 17 in multiple Aberrationen involviert war, wurde eine sequentielle mFISH- und mBAND-Analyse durchgeführt, um die klonale Translokation (4'-17) in den Metaphasen zuvor eindeutig zu identifizieren und eine mBAND-Analyse genau dieser Translokation sicherzustellen. In 94% der analysierten Metaphasen war zu dem analysierten Zeitpunkt die Translokation (4'-17) vorhanden. Wie in Abbildung 3.6b gezeigt, konnte durch eine mBAND-Färbung und Relokalisierung der zuvor mFISH-analysierten Metaphasen der Bruchpunkt des translozierten azentrischen Fragments von Chromosom 17 in der klonalen Translokation (4'-17) auf der Bande 17q21.3 lokalisiert werden. Das translozierte Fragment 17q21.3-ter war allerdings noch auf beiden homologen Chromosomen 17 vorhanden. Diese Feststellung legt nahe, dass es bei dieser chromosomalen Aberration zu einer Duplikation des terminalen Fragments 17q21.3-ter eines der homologen Chromosomen 17 am p-Arm von Chromosom 4 kam.

Neben klonal expandierenden strukturellen chromosomalen Aberrationen kam es in den Experimenten 1 und 1a zu klonalen numerischen Aberrationen in Form von Chromosomenverlusten, d.h. Monosomien. Eine nähere Analyse der an Chromosomenverlusten beteiligten Chromosomen aus Experiment 1 (PD 53, 315 Tage) ist in Abbildung 3.7 dargestellt.



**Abbildung 3.7:** Chromosomenverluste (Hyploidie) in NHDF-Zellen aus Experiment 1, 315 Tage nach Beginn der Kultivierung. (a) Zuordnung der Chromosomenverluste in aneuploiden Metaphasen aus Experiment 1. (b) Interphase-FISH-Auswertung von NHDF-Zellen aus Experiment 1, hybridisiert mit alpha-Satelliten-DNA-Sonden gegen die Chromosomen 6 und 7. Dargestellt sind die Anteile diploider Interphasezellen mit den detektierten Signalverhältnissen der Chromosomen 6 zu 7. Junge AG1522D-Zellen dienten als Referenz für Zellen ohne Aneuploidie. (c, d) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Interphase-FISH gefärbten Zellkernen (blau = DAPI, grün = Chromosom 7, rot = Chromosom 6). (c) AG1522D Zellen zeigten in 90 % der Zellen 2 Signale für die Chromosomen 6 und 7. (d) NHDF-Zellen aus Experiment 1 zeigten in 85 % der Interphasezellen eine Monosomie für das Chromosom 6, deutlich in diploiden Zellen durch das Signalverhältnis der Chromosomen 6 zu 7 von 1 zu 2 erkennbar. Eine tetraploide Zelle zeigte das Signalverhältnis der Chromosomen 6 zu 7 von 2 zu 4 (Pfeil).

Neben einem hohen sporadischen Chromosomenverlust wurde in Experiment 1 eine besonders häufige Beteiligung jeweils eines der homologen Chromosomen 6 und 13 in 97 % und 65 % der analysierten Metaphasen festgestellt (Abbildung 3.7a). Dieses Ergebnis lässt auf eine Monosomie dieser Chromosomen und klonale Expansion der betroffenen Zellen schließen. Um dies zu überprüfen, wurden Interphasezellen dieses Experiments 315 Tage nach Beginn der Kultivierung mit der Interphase-FISH-Methode und alpha-Satelliten-DNA-Sonden, spezifisch gegen Chromosom 6 und 7 gerichtet, hybridisiert. Chromosom 7 wurde dabei als Kontrolle verwendet, da es nur eine sporadische Aneuploidie in 1 % der analysierten Metaphasen zeigte und damit im Gegensatz zu Chromosom 6 zwei Signale pro Zelle zu erwarten waren. Als Vergleich wurden junge, diploide Vorhautfibroblasten (AG1522D) mit den glei-

chen Sonden hybridisiert. 85 % der ausgewerteten diploiden NHDF-Interphasezellen aus Experiment 1 (PD 53, 315 Tage) zeigten den Verlust eines der homologen Chromosomen 6 (Abbildung 3.7 b). Dies resultierte in einem Signalverhältnis der Chromosomen 6 zu 7 von 1 zu 2. Aufnahmen hybridisierter AG1522D und NHDF-Interphasezellen sind in Abbildung 3.7c und d dargestellt. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in Experiment 1 zu diesem späten Zeitpunkt (315 Tage) über 80 % der Zellen aus einer Subpopulation hervorgingen, die durch den Karyotyp 45 XY (4'-17) (-6') charakterisiert waren (Abbildung 3.5). Zusammengefasst trat in Experiment 1 eine klonal expandierende Duplikation eines Fragments von Chromosom 17 am distalen p-Arm von Chromosom 4 und später eine Monosomie für Chromosom 6 in diesen Zellen auf. Beides ging mit einer verlängerten Lebensspanne der Zellen (Abbildung 3.6) und genomischer Instabilität (Abbildung 3.4) einher.

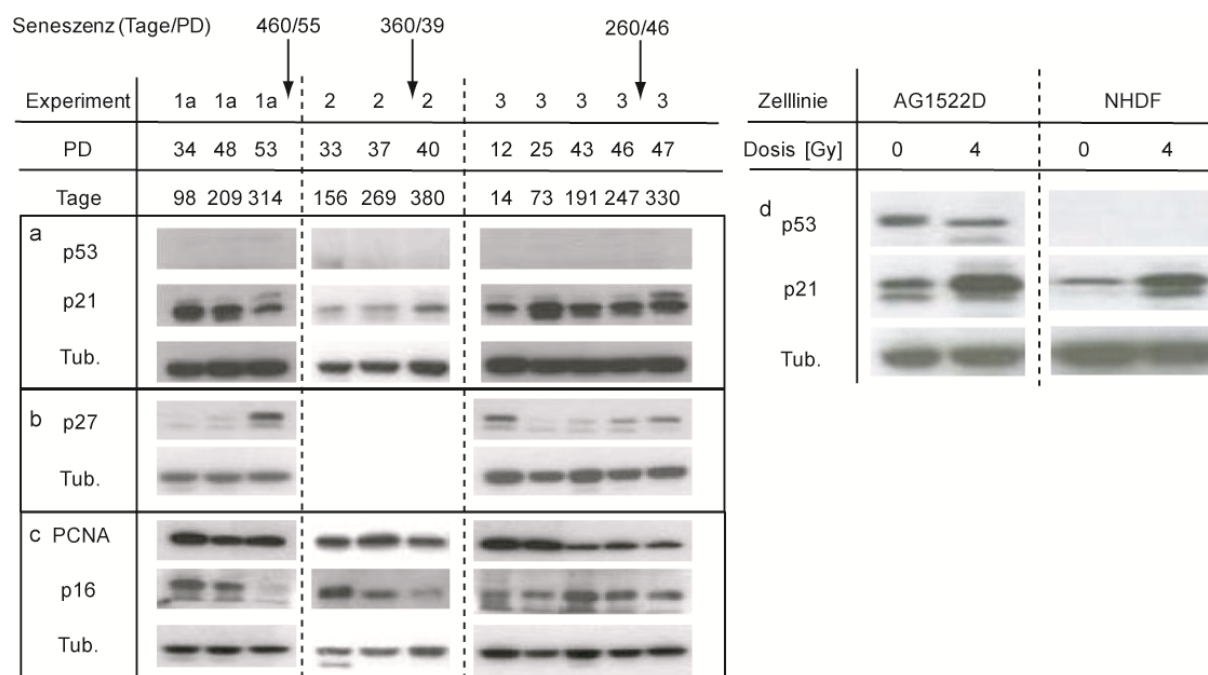
Das Auftreten von Aneuploidie in Form von Chromosomenverlusten in kryokonservierten Zellen aus Experiment 1 (Experiment 1a) zu einem mittleren Kultivierungszeitpunkt (PD 48, Tag 204) folgte einem zu Experiment 1 vergleichbaren Muster. In 99% der analysierten Metaphasen wurde ein Verlust eines der homologen Chromosomen 6 festgestellt, was zu einer deutlich erhöhten Aneuploidierate in Abbildung 3.2 führte. Die Monosomie für Chromosom 6 ging der genomischen Instabilität in zeitlicher Nähe zur Seneszenz voraus. Klonale strukturelle Aberrationen traten in diesem Experiment erst zu späteren Zeitpunkten (PD 48, Tag 204) in wenigen Metaphasen auf (5%).

Im Gegensatz zu Experiment 1 traten in den Experimenten 2 und 3 strukturelle klonale Aberrationen in zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz nur in maximal 5% der ausgewerteten Metaphasen auf, wie in Abbildung 3.4a und b deutlich wird. In diesen Experimenten wurden keine Monosomien festgestellt.

### **3.1.1.2 Langzeitentwicklung der Proteinexpression in NHDF-Zellen**

Da NHDF-Zellen in allen Experimenten trotz zytogenetischer Veränderungen und unterschiedlich ausgedehnter Proliferationsaktivität die replikative Seneszenz erreichten, wurde die Expression verschiedener zellzyklusrelevanter Proteine in Zelllysaten mittels der Western-Blot-Methode analysiert. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf Proteine, deren regulatorische Funktion der Seneszenz zugeschrieben wird (p53, p21, p27, p16). Zusätzlich wurde der Replikations-Kofaktor PCNA als ein Indikator der Proliferationsaktivität untersucht. In Abbildung 3.8a, b und c ist die im Western-Blot beobachtete Entwicklung der Proteinexpression für die Experimente 1a, 2 und 3 über die Kultivierungszeit dargestellt. Für Experiment 1 wurden keine Zelllysate angefertigt.

## Ergebnisse – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten



**Abbildung 3.8:** Repräsentative Western-Blots der Langzeitentwicklung der Proteinexpression bzw. -akkumulation in NHDF-Zellen von (a) p53, p21, (b) p27, PCNA und (c) p16 der Experimente 1a (n = 2), 2 (n = 1) und 3 (n = 2) zu verschiedenen Zeitpunkten der Langzeitkultivierung sowie für (d) eine strahleninduzierte Expression von p53 und p21 in jungen AG1522D- und NHDF-Zellen 4 h nach einer Bestrahlung mit 4 Gy Röntgenstrahlung (n = 2). Tubulin wurde zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge detektiert. (n = Anzahl der Aufträge).

Das Tumorsuppressorprotein p53 konnte in keinem der Experimente in NHDF-Zellen nachgewiesen werden. Es wurde daher eine strahleninduzierte Akkumulation bzw. Expression der zellzyklus-regulierenden Proteine p53 und p21 überprüft (Abbildung 3.8d). Zu diesem Zweck wurden konfluente junge NHDF-Zellen mit einer Dosis Röntgenstrahlung von 4 Gy bestrahlt und 4 h nach der Bestrahlung Zelllysate angefertigt, die im Western-Blot analysiert wurden. Als Vergleich wurden Vorhautfibroblasten (AG1522D) mitgeführt, die eine strahleninduzierte Akkumulation bzw. Expression von p53 und p21 zeigen (Fournier *et al.* 2004). Wie in Abbildung 3.8d dargestellt, konnte in NHDF-Zellen trotz Bestrahlung keine Akkumulation zellulärer p53-Mengen nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten allerdings ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau von p21, vergleichbar mit AG1522D-Zellen.

Da die analysierten Zeitpunkte der Proteinexpression für Experiment 3 die gesamte Kultivierungsdauer abdecken, wird dieses Experiment zuerst betrachtet. Außerdem traten in Experiment 3 keine klonalen chromosomalen Aberrationen auf und die Zellen zeigten in mFISH-Analysen die niedrigste Aberrationsrate. Auch mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz (PD 46, 260 Tage) wurde trotz der nicht nachweisbaren Expression von p53 eine leicht erhöhte Expression von p21 beobachtet. Für den CDK-Inhibitor p27, der unabhängig von p53 induziert wird (Collado *et al.* 2000), wurde nach einer einmalig erhöhten Expression zu Beginn der Kultivierung eine niedrigere Expression detektiert, die mit zunehmender Kultivierungsdauer deutlicher wurde und bis nach Erreichen der Seneszenz anhielt. Eine stärkere

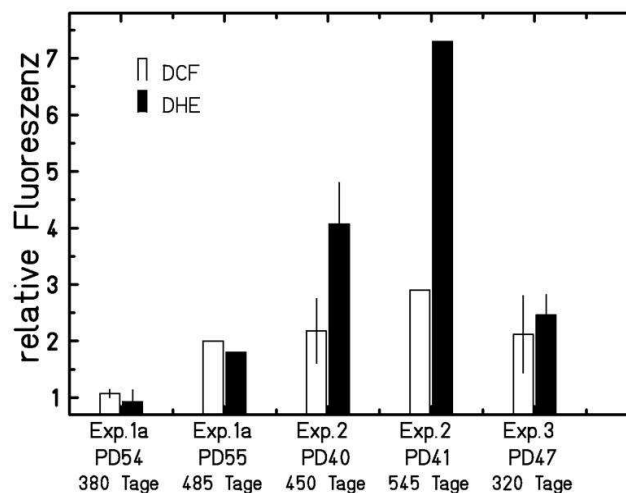
Expression mit fortschreitender Kultivierungsdauer wurde auch für p16 beobachtet. Das Niveau des Replikations-Kofaktors PCNA sank deutlich nach einer Kultivierungsdauer von 191 Tagen (PD 43). Für das Experiment 2, in dem ebenfalls keine klonalen Aberrationen vorlagen, aber eine hohe Aberrationsrate beobachtet wurde (63 %), wurden Zelllysate erst ab einem späten Zeitpunkt Kultivierung (PD 33, 156 Tage) angefertigt. Für p21 zeigte sich in diesem Experiment erst kurz nach Erreichen der Seneszenz ein leichter Anstieg (PD 39, 360 Tage). Die PCNA- wie auch p16-Expression ging jedoch deutlich zurück. p27 wurde für dieses Experiment nicht detektiert.

Experiment 1a zeigte mit der Expansion einer klonalen Subpopulation (PD 48, 209 Tage) und hoher Aberrationsrate (75 %) die deutlichsten zytogenetischen Veränderungen. Auch wurde ebenfalls ein von den Experimenten 2 und 3 abweichendes Expressionsmuster von zellzyklusregulierenden Proteinen beobachtet. Obwohl die Expression von PCNA entsprechend der reduzierten Proliferation zurückging, kam zu einer schwächeren Expression von p21 bereits vor dem Einsetzen der Seneszenz (PD 53, 314 Tage). Die Expression von p27 stieg allerdings zu diesem Zeitpunkt deutlich an.

### **3.1.1.2 ROS-Akkumulation in NHDF-Zellen**

Da sowohl zwischen genomischer Instabilität als auch der Regulierung des Zellzyklus und der Seneszenz ein Zusammenhang zur intrazellulären Akkumulation von ROS hergestellt wird (Bertram und Hass 2008, Droege 2002, Harman 1956), wurde die Langzeitentwicklung der zellulären ROS-Mengen von NHDF-Zellen, vor allem zu späten Kultivierungszeitpunkten, untersucht. Die ROS-Niveaus in NHDF-Zellen der Experimente 1a, 2 und 3 wurden mittels durchflusszytometrischer Messungen der durch ROS oxidierbaren Fluorochrome DCFH-DA und DHE im Vergleich zu jungen Zellen bestimmt. In Abbildung 3.9 sind die Fluoreszenzintensitäten aus den Experimenten 1a, 2 und 3 zu späten Kultivierungszeitpunkten in Relation zu parallelen Messungen junger Zellen dargestellt.





**Abbildung 3.9:** ROS-Akkumulation in NHDF-Zellen zu späten Zeitpunkten der Kultivierung für die Experimente 1a, 2 und 3 ermittelt durch durchflusszytometrische Messung der DCF- und DHE-Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zu jungen NHDF-Zellen. (Exp.1a: 380 Tage n = 2, 485 Tage n = 1; Exp.2: 450 Tage n = 1; 545 Tage n = 1; Exp.3 320 Tage n = 2). (n = Anzahl Proben).

Für Experiment 1a wurde in proliferationsaktiven Zellen (PD 54, 380) kein Unterschied der DCF- und DHE-Fluoreszenzen zu jungen Zellen festgestellt. Nach dem Erreichen der Seneszenz (PD 55, Tag 485) wurde ein 2-fach erhöhtes ROS-Niveau beobachtet. In Experiment 2 kam es in seneszenten Zellen (PD 40, 450 Tage) ebenfalls zu einer 2-fach erhöhten DCF- und 4-fach erhöhten DHE-Fluoreszenz. Mit vorschreitendem Alter der Kultur stieg die DCF-Fluoreszenz nochmals an (3-fach), die DHE-Fluoreszenz sogar sehr deutlich auf ein vielfaches junger NHDF-Zellen (7-fach). In Experiment 3 wurde in seneszenten Zellen für beide Fluorochrome ebenfalls eine 2-fach erhöhte Fluoreszenz beobachtet.

### Zusammenfassung der Langzeitentwicklung von NHDF-Zellen

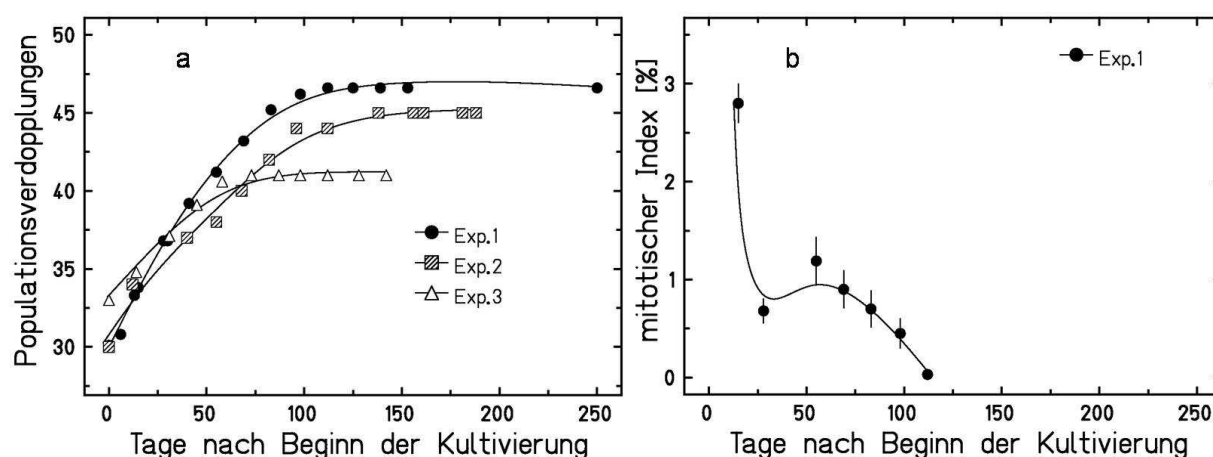
Für drei unabhängige *in vitro* Langzeitkultivierungen von NHDF-Zellen wurde ein jeweils anderes Proliferationsverhalten der Massenkulturen bezüglich der Länge der teilungsaktiven Phase, dem Zeitpunkt der replikativen Seneszenz und damit Unterschiede in den maximal erreichten PDs beobachtet. In allen Experimenten kam es zu mittleren Zeitpunkten der Kultivierung zu einem Anstieg der Anteile strukturell aberranter Zellen, das Niveau junger Zellen wurde kurz darauf allerdings wieder erreicht. Mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz wurde erneut eine Zunahme strukturell und auch numerisch aberranter Zellen beobachtet, wobei in den verschiedenen Experimenten unterschiedliche Niveaus erreicht wurden. In allen Experimenten traten klonale strukturelle Aberrationen auf, die unterschiedlich stark expandierten. Zu einer starken klonalen Expansion kam es in den Experimenten 1 und 1a mit einer in beiden Experimenten auftretenden Monosomie von Chromosom 6. In Experiment 1 kam es zusätzlich zur starken Expansion einer Duplikation chromosomalen Materials von Chromosom 17 (4'-17). Bezüglich der Expression zellzyklusregulierender Proteine wurden eben-

falls Unterschiede zwischen den Experimenten beobachtet, die für Experiment 1a in Bezug auf die CDK-Inhibitoren p21 und p16 von einer erwarteten Proteinexpression in seneszenten Fibroblasten deutlich abwichen. In allen Experimenten wurde ein Anstieg intrazellulärer ROS-Mengen im Vergleich zu jungen Zellen erst nach dem Erreichen der Seneszenz beobachtet. Dieser wurde in einem Experiment (2) in den seneszenten Zellen mit fortschreitender Kultivierungsdauer noch deutlicher.

## 3.1.2 Langzeitentwicklung von IMR-90-Zellen

### 3.1.2.1 Proliferation von IMR-90-Zellen in Langzeitkulturen

Die Proliferationsaktivität von IMR-90-Zellen ist in Abbildung 3.10a als die Zunahme von PDs über die Kultivierungsdauer für drei unabhängige Experimente dargestellt.



**Abbildung 3.10:** Proliferation von IMR-90-Zellen in drei Experimenten (Exp.1/2/3). (a) Zunahme der PDs und (b) Entwicklung des mitotischen Index in Experiment 1 über die Kultivierungsdauer, bestimmt aus Giemsa-Analysen.

Zu Beginn der Experimente hatten alle IMR-90-Zellen bereits 30 PDs durchlaufen. Für Experiment 1 und 2 wurde eine vergleichbare Proliferationsaktivität während der teilungsaktiven Phase beobachtet. In Experiment 3 war diese geringer. Die Zeitpunkte der replikativen Seneszenz und die dabei maximal erreichten PDs aller Experimente sind in Tabelle 3.2 angegeben.

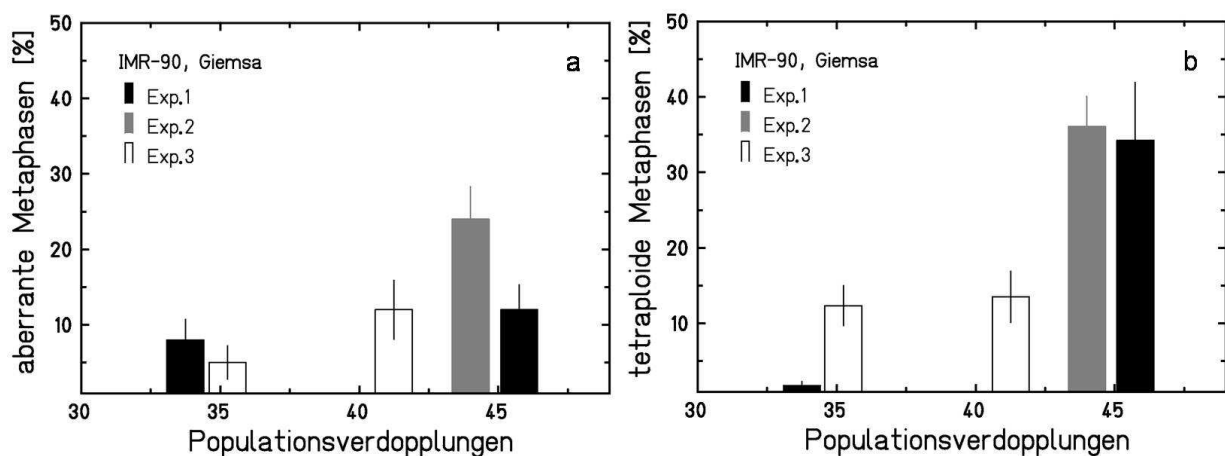
**Tabelle 3.2:** Maximal erreichte PDs und Tage nach Beginn der Kultivierung zum Zeitpunkt des Einsetzens der replikativen Seneszenz in IMR-90-Zellen. Replikative Seneszenz wurde definiert als der Kultivierungszeitpunkt, ab dem keine Zunahme von PDs mehr beobachtet wurde.

Experiment/Erreichen der Seneszenz	Exp.1	Exp.2	Exp.3
Maximal erreichte PDs	47	45	41
Tage nach Beginn der Kultivierung	100	120	60

Die zeitliche Entwicklung des mitotischen Index ist exemplarisch für Experiment 1 in Abbildung 3.10b gezeigt. Der höchste mitotische Index von 2,8 % wurde kurz nach Beginn der Kultivierung beobachtet. Während der teilungsaktiven Phase ging dieser im Mittel auf 0,8 % und mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz auf unter 0,4 % zurück.

### 3.1.2.2 Zytogenetische Langzeitentwicklung von IMR-90-Zellen

In Abbildung 3.11 ist die zytogenetische Langzeitentwicklung von IMR-90-Zellen anhand der Ergebnisse von Giemsa-Analysen eines repräsentativen frühen und späten Kultivierungszeitpunktes dargestellt. Für Experiment 2 lag kein früher Analysenzeitpunkt vor.

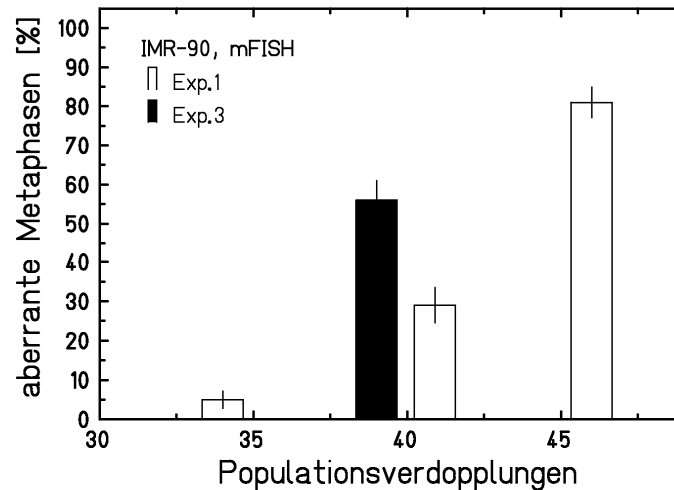


**Abbildung 3.11:** Zytogenetische Langzeitentwicklung von IMR-90-Zellen, dargestellt anhand der Ergebnisse von Giemsa-Analysen eines repräsentativen frühen Zeitpunktes nach Beginn der Kultivierung sowie in zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz. Zeitliche Entwicklung der Anteile (a) aberranter und (b) tetraploider Metaphasen.

In den Experimenten 1 und 3 wurde ein schwacher Anstieg der Anteile aberranter Zellen mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz beobachtet (Abbildung 3.11a). In Experiment 2 wurde im Vergleich zu den anderen Experimenten ein 2-fach höherer Anteil aberranter Metaphasen kurz vor dem Erreichen der replikativen Seneszenz beobachtet. Allerdings lag für dieses Experiment kein früher Analysenzeitpunkt vor, um einen Anstieg der Anteile aberranter Metaphasen über die Kultivierungsdauer festzustellen. Die in den Experimenten 1 und 3 beobachteten Aberrationstypen waren Chromosomen- und Chromatidbrüche. Die zeitliche Entwicklung tetraploider Metaphasen ist in Abbildung 3.11b dargestellt. In den Experimenten 2 und 3 wurde mit dem Erreichen der Seneszenz jeweils ein hoher Anteil von 30-35 % tetraploide Metaphasen festgestellt. In Experiment 1 konnte ein deutlicher Anstieg über die Kultivierungsdauer beobachtet werden, während für Experiment 2 kein früher Analysenzeitpunkt vorlag. Experiment 3 zeigte ein konstantes Niveau von 12 % tetraploiden Metaphasen über die gesamte Kultivierungsdauer. Aneuploidie wurde in Form von Chromosomenverlusten nur

in Experiment 3 in 20 % der analysierten Metaphasen mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz beobachtet (nicht gezeigt).

In Abbildung 3.12 sind Ergebnisse der mFISH-Analysen von IMR-90-Zellen der Experimente 1 und 3 für einen repräsentativen frühen, mittleren und späten Kultivierungszeitpunkt dargestellt.

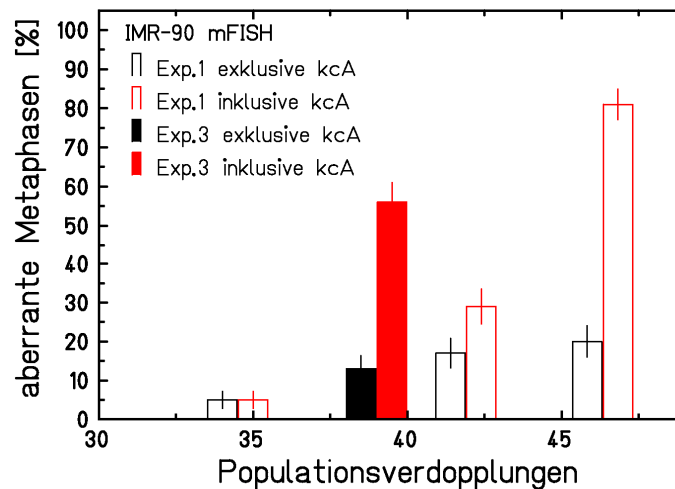


**Abbildung 3.12:** Zeitliche Entwicklung der Anteile von Metaphasen mit strukturellen Aberrationen in IMR-90-Zellen der Experimente 1 und 3 aus mFISH-Analysen. Für Experiment 3 lag nur ein Analysenzeitpunkt vor.

In Experiment 1 kam es zu einem deutlichen Anstieg der Anteile aberranter Metaphasen über die Kultivierungsdauer. Nach Beginn der Kultivierung (PD 34, Tag 15) wurden 5 % aberrante Metaphasen beobachtet, gefolgt von einer Zunahme auf 31 % (PD 41, Tag 55) und maximal 81 % (PD 46, Tag 83) kurz vor dem Erreichen der replikativen Seneszenz. Für Experiment 3 traten kurz vor der replikativen Seneszenz (PD 39, Tag 45) 56 % aberrante Metaphasen auf. Der in beiden Experimenten zu allen Zeitpunkten am häufigsten vertretene Aberrationstyp waren unvollständige, einfache Translokationen.

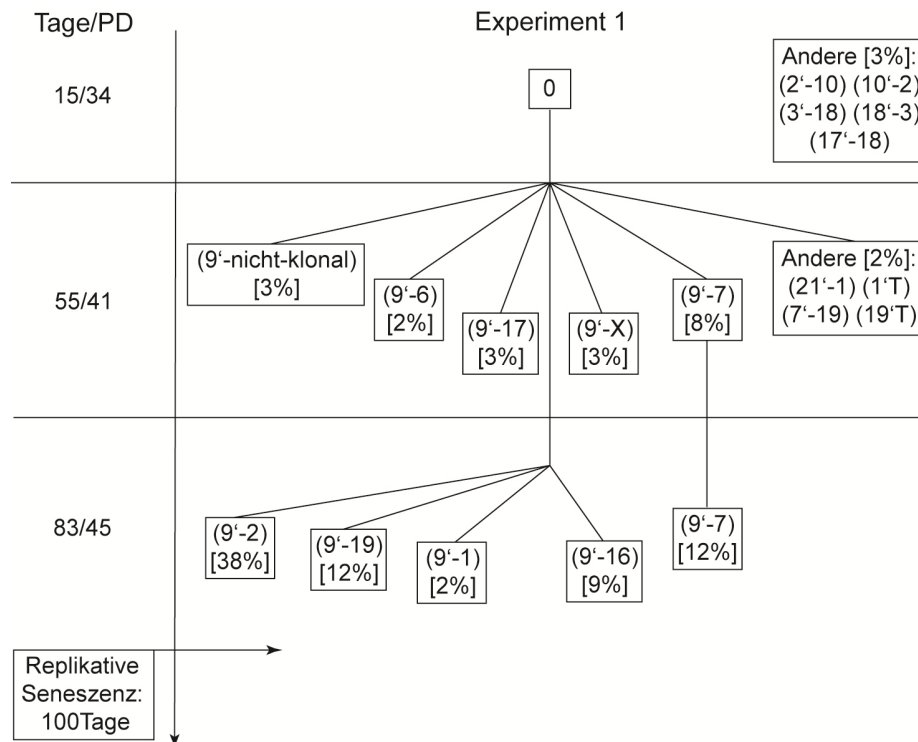
### 3.1.2.3 Klonale Aberrationen in IMR-90-Zellen

Die mFISH-Analysen der Experimente 1 und 3 zeigten, dass die beobachtete Zunahme an Translokationen auf deren klonale Expansion zurückging. Dabei wurden vergleichbare Aberrationsmuster festgestellt. In Abbildung 3.13 ist die klonale Expansion von Aberrationen und deren Auswirkung auf die Anteile aberranter Metaphasen berücksichtigt. Strukturelle chromosomale Aberrationen wurden für jede aufgetretene klonale Aberrationen entweder nur als eine Aberration, unabhängig von deren Expansionsrate und Gesamtzahl („exklusive kcA“), oder jede klonale Aberration als eine eigenständige Aberration gewertet („inklusive kcA“).



**Abbildung 3.13:** Zeitliche Entwicklung der Anteile von Metaphasen mit strukturellen Aberrationen in IMR-90-Zellen für einen frühen (Exp.1), mittleren (Exp.1) und späten (Exp.1 und 3) Kultivierungszeitpunkt aus mFISH-Analysen. Alle klonalen chromosomalen Aberrationen (kcA) wurden entweder nur als eine Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“) oder als einzelne, eigenständige Aberration mehrfach („inklusive kcA“) gewertet.

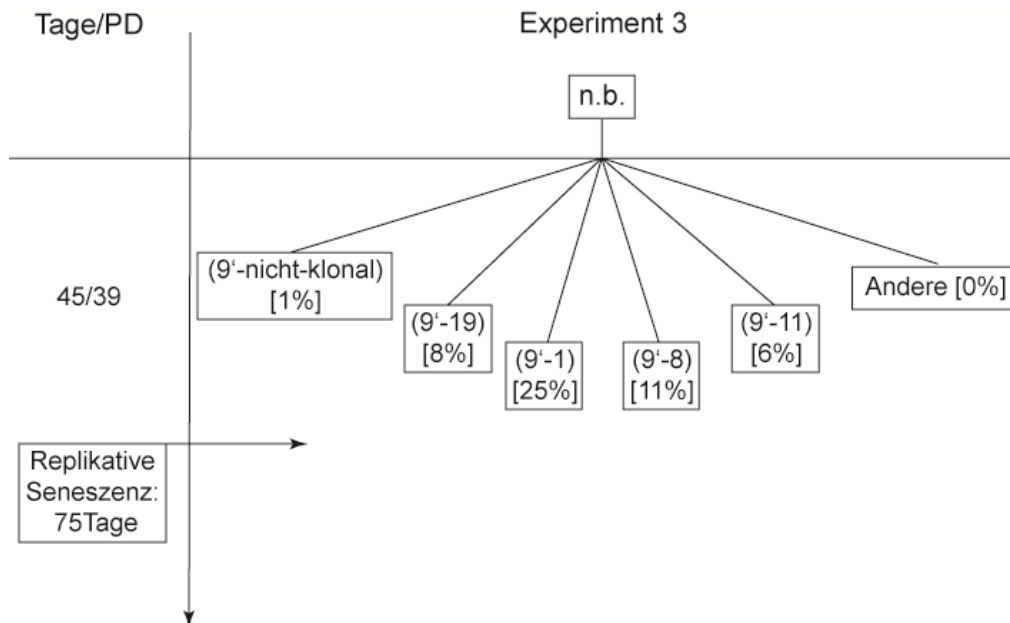
In Experiment 1 wurden zu einem mittleren Kultivierungszeitpunkt klonale Aberrationen beobachtet (PD 41, Tag 55). Wurde zu diesem Zeitpunkt jede klonale Aberration als eigenständige Aberrationen und damit mehrfach gewertet, kam es zu einer Zunahme der Anteile aberranter Metaphasen um 10 %. Alle zu diesem Zeitpunkt aufgetretenen klonalen Aberrationen waren einfache, unvollständige Translokationen. Auffällig war eine Beteiligung von Chromosom 9 an allen klonalen Aberrationen. Es kam dabei zu Translokationen mit unterschiedlichen Donor-Chromosomen, von denen ein azentrisches Fragment an das distale Ende des q-Arms eines der homologen Chromosomen 9 transloziert war. Abbildung 3.14 zeigt eine detailliert Aufstellung der klonalen Aberrationen in Experiment 1 über die Kultivierungsdauer.



**Abbildung 3.14:** Stammbaum der Expansion klonaler Aberrationen in IMR90-Zellen aus Experiment 1 über die Kultivierungsdauer. Der prozentuale Anteil von Zellen mit klonalen Aberrationen an der Gesamtzahl der analysierten Metaphasen des jeweiligen Analysenzeitpunktes ist angegeben. Translokationen, an denen Chromosom 9 beteiligt war und die nicht klonal expandierten, kamen nur zu einem Analysenzeitpunkt nach 55 Tagen in 3 % der analysierten Metaphasen vor („nicht-klonal“). Translokationen, an denen Chromosom 9 nicht beteiligt war und die ebenfalls nicht klonal expandierten, sind, wenn aufgetreten, ebenfalls angegeben („Andere“).

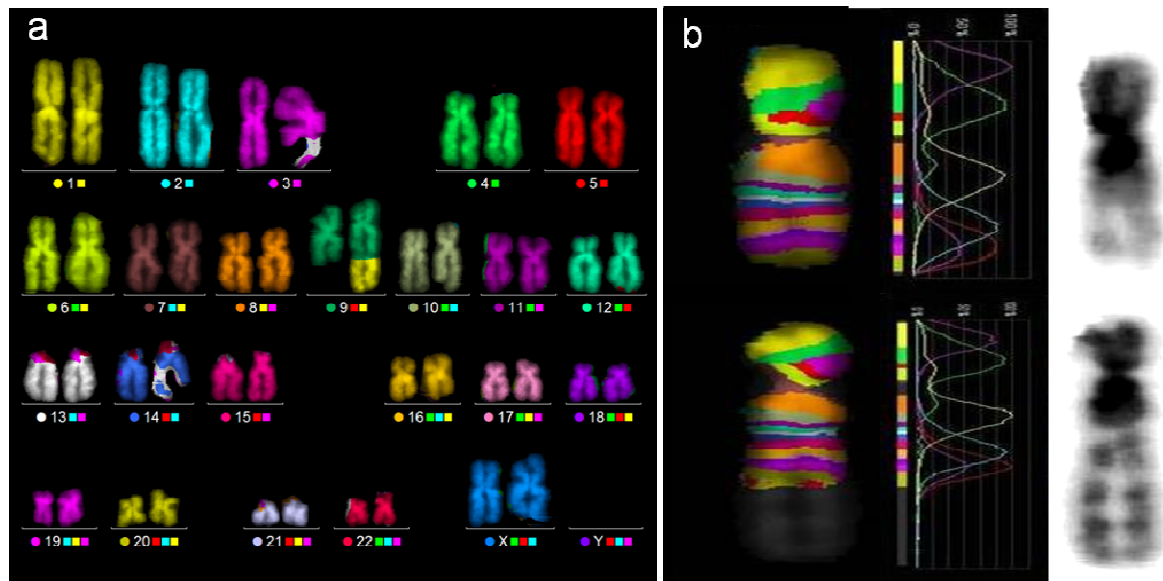
Zu einem späten Zeitpunkt der Kultivierung (PD 46, Tag 83) expandierten Zellen mit diesem klonalen Aberrationsmuster auf insgesamt 73 % der analysierten Metaphasen. Die einzelnen klonalen Subpopulationen expandierten dabei unterschiedlich stark, maximal bis auf 32 % der analysierten Metaphasen (Translokation (9'-2)). Die Donor-Chromosomen der azentrischen Fragmente unterschieden sich im Vergleich zum mittleren Zeitpunkt (PD 41, Tag 55). Nur die klonale Translokation (9'-7) trat zu zwei Analysenzeitpunkten auf (Tag 55 und 83). Durch die Expansion von Zellen mit klonalen Aberrationen kam es zu einer deutlichen und 4-fachen Steigerung der Anteile aberranter Metaphasen (Abbildung 3.13).

Für Experiment 3 wurde nur ein Zeitpunkt (PD 39, Tag 45) mittels der mFISH-Methode analysiert. Es wurde ebenfalls eine klonale Expansion chromosomaler Aberrationen in 51 % der ausgewerteten Metaphasen detektiert. Es handelte sich, wie in Experiment 1, um einfache unvollständige Translokationen zwischen dem distalen Ende des q-Arms von Chromosom 9 und azentrischen Fragmenten diverser Donor-Chromosomen (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15:** Stammbaum der Expansion klonaler Aberrationen in IMR90-Zellen aus Experiment 3 zu einem mittleren Kultivierungszeitpunkt (45 Tage). Der prozentuale Anteil von Zellen mit klonalen Aberrationen an der Gesamtzahl der analysierten Metaphasen des jeweiligen Analysenzeitpunktes ist angegeben. Translokationen, an denen Chromosom 9 beteiligt war und die nicht klonal expandierten, traten nur in 1 % der analysierten Metaphasen auf („nicht-klonal“). Translokationen an denen Chromosom 9 nicht beteiligt war und die ebenfalls nicht klonal expandierten wurden nicht detektiert („Andere“). (n.b. = nicht bestimmt)

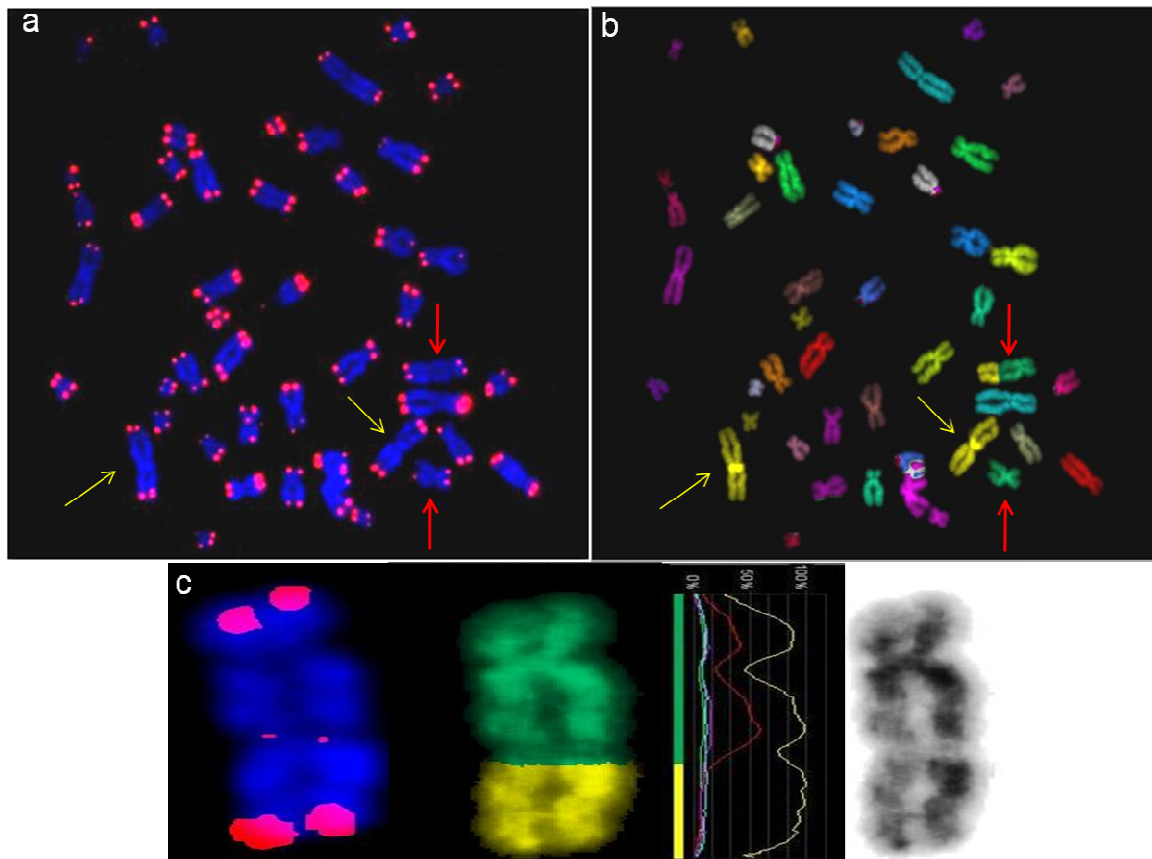
Die Donor-Chromosomen der azentrischen Fragmente unterschieden sich im Vergleich zu Experiment 1. Eine in beiden Experimenten auftretende Translokation fand zwischen Chromosom 9 und einem azentrischen Fragment von Chromosom 1 (9'-1) statt. Ein mFISH-gefärbter Karyotyp mit dieser klonalen Translokation (9'-1) ist in Abbildung 3.16a gezeigt. Beide homologen Chromosomen 1 zeigten dabei keinen Verlust chromosomalen Materials, wie bei einer unvollständigen Translokation erwartet. Aufgrund der Beteiligung des distalen Ende des q-Arms von Chromosom 9 an allen klonalen Aberrationen der Experimente 1 und 3 wurde eine mBAND-Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gegen Chromosom 9 für Experiment 1 zu einem späten Zeitpunkt nach Beginn der Kultivierung (PD 46, 83 Tage) durchgeführt. Das Ziel war zu untersuchen, ob bei allen klonalen Translokationen ein gemeinsamer Bruchpunkt auf dem q-Arm von Chromosom 9 vorlag. In 56 % der analysierten Metaphasen wurde mit der mBAND-Methode eine Beteiligung von Chromosom 9 an Translokationen, die den klonalen Aberrationstypen entsprachen, festgestellt. Dies entspricht dem Ergebnis der mFISH-Analyse dieses Zeitpunktes (51 %). Wie exemplarisch in Abbildung 3.16b dargestellt, konnten auf den derivatisierten Chromosomen 9 keine Bruchpunkte oder Umordnungen im Zusammenhang mit den beobachteten Translokationen festgestellt werden und das Chromosom 9 war in allen Fällen vollständig. Unter Berücksichtigung der Auflösungsgrenze der mBAND-Methode von 2-3 Mbp (Saracoglu *et al.* 2001) ist daher eine Beteiligung der Telomerregionen von Chromosom 9, die nicht von den mBAND-Sonden erfasst werden, an der Entstehung der Aberrationen naheliegend.



**Abbildung 3.16:** (a) mFISH gefärbter Karyotyp im kombinatorischen Falschfarbenmodus einer IMR-90-Metaphase aus Experiment 3 (55 Tage) mit der klonalen Translokation (9'-1), die in 25% der analysierten Metaphasen auftrat. Keines der homologen Chromosomen 1 weist eine Deletion auf, wie bei einer unvollständigen Translokation erwartet. Dies weist auf eine Duplikation eines Fragments von Chromosom 1 hin. (b) mBAND-gefärbtes „normales“ Chromosom 9 (oben) sowie ein derivatisiertes Chromosom 9, beteiligt an einer Aberration (unten), aus einer IMR-90-Metaphase des Experiment 1 (PD 46, 83 Tage) im kombinatorischen Falschfarbenmodus und einer gewählten Auflösung von 17 Falschfarben-Bändern. Es konnten keine intrachromosomalen Veränderungen oder Bruchpunkte auf dem derivatisierten Chromosom 9 (unten) festgestellt werden.

Um eine Beteiligung der Telomerregion des q-Arms von Chromosom 9 an den klonalen Aberrationen zu überprüfen, wurde eine sequentielle Telomer-FISH- und mFISH-Färbung der IMR-90-Metaphasen aus Experiment 3 des späten Zeitpunktes durchgeführt (PD 49, 45 Tage). Abbildung 3.17 zeigt eine sequentiell hybridisierte Metaphase und eine vergrößerte Darstellung der Translokation (9'-1) nach Telomer-FISH- sowie mFISH-Färbung.



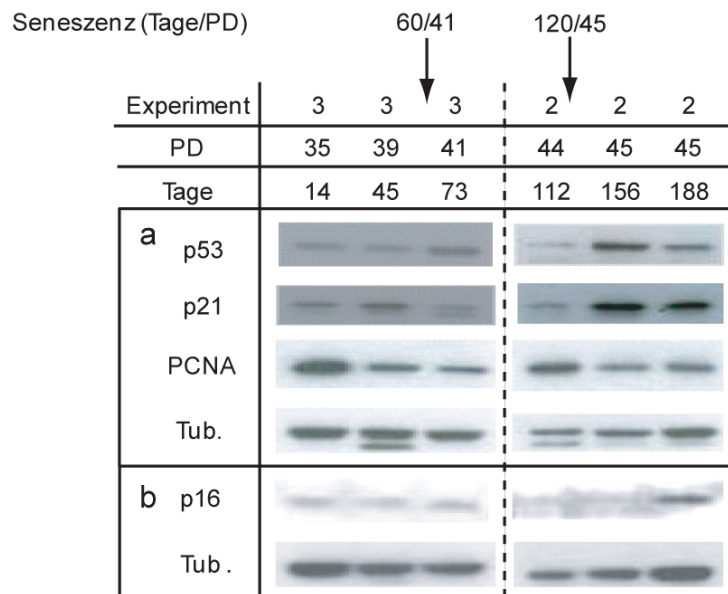


**Abbildung 3.17:** (a) Telomer-FISH- und (b) mFISH-gefärbte Metaphase des in Abbildung 3.16a dargestellten Karyotyps. Beide der homologen Chromosomen 1 und 9, von denen in beiden Fällen jeweils eines an der klonalen Translokation (9'-1) beteiligt war, sind mit Pfeilen markiert (Chromosom 1: gelb, Chromosom 9: rot). (c) Vergrößerte Darstellung des derivatisierten Chromosoms (9'-1) aus derselben Metaphase nach Telomer-FISH- und mFISH-Färbung. Telomersignale am derivatisierten Chromosom (9'-1) sind an beiden distalen Enden vorhanden. Zusätzlich sind schwache Telomersignale am Fusionspunkt der Translokation sichtbar. Alle Aufnahmen stammen von derselben Metaphase.

Das derivatisierte Chromosom (9'-1) zeigte neben den Telomersignalen an den distalen Enden beider Arme schwache interstitielle Telomersignale am Fusionspunkt der Translokation (Abbildung 3.17c). Alle Telomersignale der homologen Chromosomen 1 in dieser Metaphase waren vorhanden. Dies weist damit zusätzlich auf eine Vollständigkeit der Donor-Chromosomen und eine Duplikation des translozierten Fragments von Chromosom 1 hin.

#### 3.1.1.4 Langzeitentwicklung der Proteinexpression in IMR-90-Zellen

Die Langzeitentwicklung der Expression zellzyklusregulierender Proteine wurde in IMR-90-Zellen für die Experimente 2 und 3 mittels der Western-Blot-Methode untersucht (Abbildung 3.18a und b).



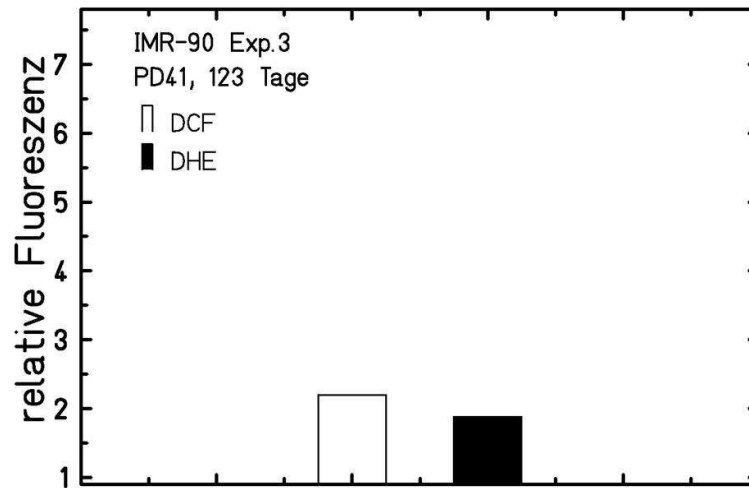
**Abbildung 3.18:** Repräsentative Western-Blots der Proteinexpression in IMR-90-Zellen von p53, p21 und PCNA der Experimente 2 (n = 2) und 3 (n = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten der Langzeitkultivierung. (b) Detektion von p16 auf einem anderen Western Blot. Tubulin wurde zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge detektiert. (n = Anzahl der Aufträge).

Für Experiment 3 wurden Zelllysate von drei repräsentativen Zeitpunkten der Kultivierung untersucht. Es wurde keine Änderung der zellulären Mengen des Tumorsuppressorproteins p53 sowie der Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p16 über die Kultivierungsdauer beobachtet. Mit abnehmender Proliferationsaktivität kam es zu einem Rückgang der Expression des Replikations-Kofaktors PCNA (PD 39, 45 Tage).

Für Experiment 2 lagen Zelllysate erst ab einem Zeitpunkt kurz vor dem Erreichen der replikativen Seneszenz vor. Es wurde eine Akkumulation von p53 nach dem Erreichen der Seneszenz beobachtet, einhergehend mit einer ansteigenden Expression von p21. Die Expression von PCNA ging mit dem Erreichen der Seneszenz zurück. Ein Anstieg der p16-Expression wurde erst 60-70 Tage nach dem Eintritt in die Seneszenz festgestellt (PD 45, 188 Tage).

### 3.1.1.5 ROS-Akkumulation in IMR-90-Zellen

Eine alterungsbedingte Akkumulation von ROS in IMR-90-Zellen aus Experiment 3 wurde durch Oxidation der ROS-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffe DCFH-DA und DHE im Vergleich zu jungen Zellen ermittelt. Die relativen Fluoreszenzintensitäten von DCF und DHE waren nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz (PD 42, 93 Tage) 2-fach gegenüber jungen Zellen (PD 30, 14 Tage) erhöht (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19:** ROS-Akkumulation in IMR-90-Zellen zu einem späten Zeitpunkt der Kultivierung (PD 42, 93 Tage) für Experiment 3, ermittelt durch durchflusszytometrische Messung der DCF- und DHE-Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zu jungen IMR-90-Zellen (PD 30, 14 Tage). (n = 1; n = Anzahl Proben).

### Zusammenfassung der Langzeitentwicklung von IMR-90-Zellen

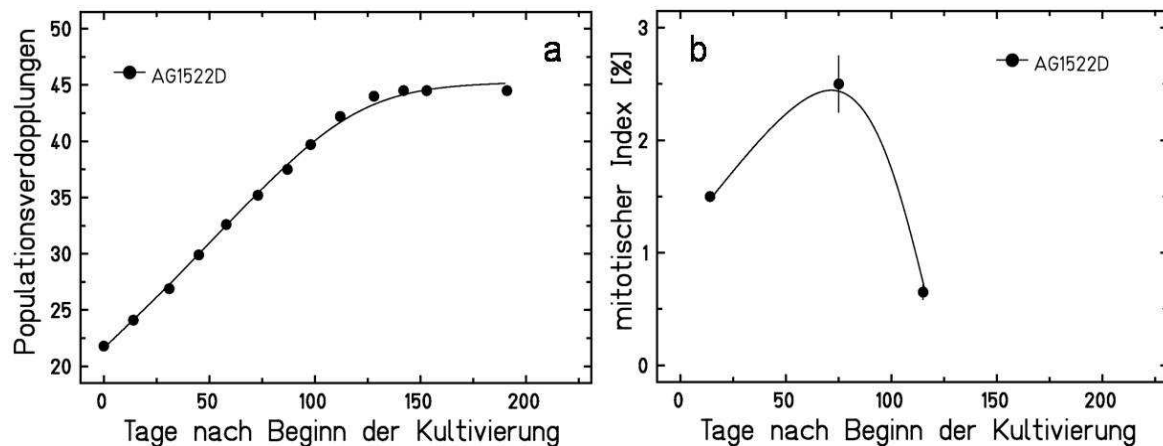
In drei Langzeitexperimenten von IMR-90-Zellen wurde jeweils ein unterschiedliches Proliferationsverhalten beobachtet. Vor allem in einem Experiment (Experiment 3) kam es zu einer deutlich kürzeren teilungsaktiven Phase. Die für Experiment 1 und 3 durchgeführten mFISH-Analysen zeigten eine starke Expansion von Zellen mit Duplikationen chromosomalen Materials verschiedener Donor-Chromosomen am distalen Ende eines der homologen Chromosomen 9. mBAND- und Telomer-FISH-Analysen der klonalen Aberrationen zeigten eine Beteiligung der Telomerregion von Chromosom 9 an diesen Aberrationstypen. Bezüglich der Langzeitentwicklung der Expression zellzyklusregulierender Proteine wurde in IMR-90-Zellen kurz nach dem Erreichen der Seneszenz eine Akkumulation von p53 und stärkere Expression von p21 beobachtet. Erhöhte zelluläre Mengen von p16 wurden erst deutlich später festgestellt. Mit dem Rückgang der Proliferation kam es zu einer reduzierten PCNA-Expression. In seneszenten IMR-90-Zellen wurde eine 2-fach höhere ROS-Menge im Vergleich zu jungen Zellen festgestellt.

### 3.1.3 Langzeitentwicklung von AG1522D-Zellen

#### 3.1.3.1 Proliferation von AG1522D-Zellen in Langzeitkulturen

AG1522D-Zellen wurden in einem Langzeitexperiment über einen Zeitraum von 190 Tagen kultiviert (Abbildung 3.20a). Die teilungsaktive Phase dauerte bis 112 Tage (PD 42) nach Beginn der Kultivierung an. Nach einem Rückgang der Proliferationsaktivität wurde die replikative Seneszenz nach 130 Tagen (PD 45) erreicht. Der mitotische Index der Population ist

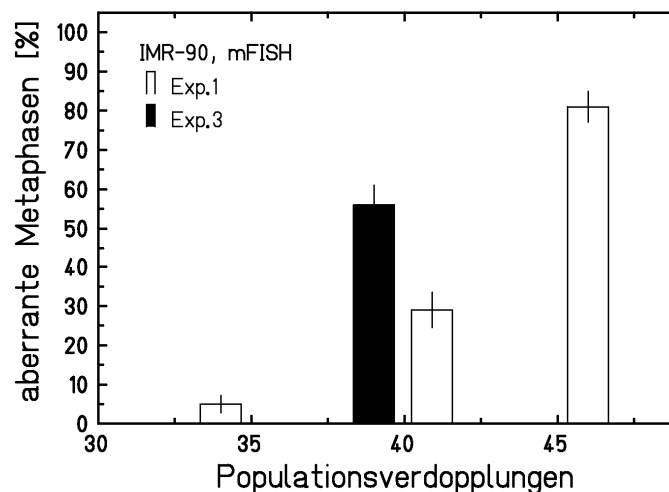
in Abbildung 3.20b dargestellt. Dieser stieg während der proliferationsaktiven Wachstumsphase leicht von 1,5 % auf 2,5 % und ging mit dem Erreichen der Seneszenz auf 0,7 % zurück.



**Abbildung 3.20:** Proliferation von AG1522D-Zellen. (a) Zunahme der PDs und (b) Entwicklung des mitotischen Index über die Kultivierungsdauer aus Giemsa-Analysen.

### 3.1.3.2 Zytogenetische Langzeitentwicklung von AG1522D-Zellen

Giemsa-Analysen wurden für drei repräsentative Zeitpunkte und zusätzlich eine mFISH-Analyse für einen späten Zeitpunkt der Kultivierung von AG1522D-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 dargestellt.



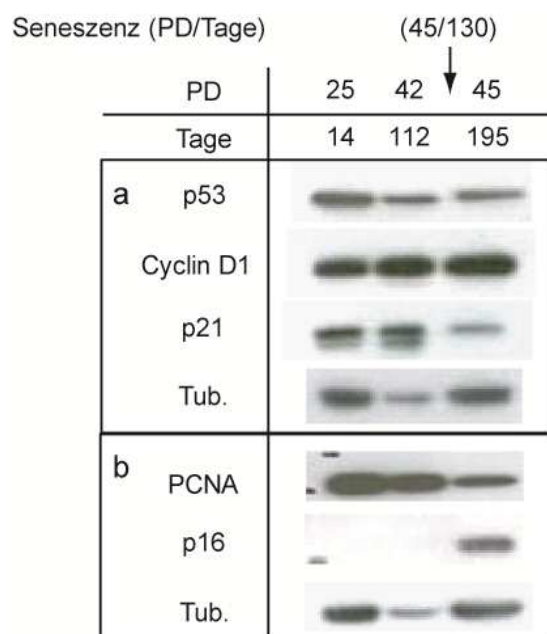
**Abbildung 3.21:** Zeitliche Entwicklung der Anteile von Metaphasen mit strukturellen Aberrationen in AG1522D-Zellen für einen frühen, mittleren und späten Zeitpunkt der Kultivierung aus Giemsa- und einen späten Zeitpunkt aus mFISH-Analysen.

Für AG1522D-Zellen wurde über die gesamte Kultivierungsdauer ein niedriger Anteil aberranter Metaphasen beobachtet. Zu Beginn der Kultivierung (PD 24, 14 Tage) zeigten 3 % der analysierten Metaphasen strukturelle Aberrationen. Für einen mittlere Kultivierungszeitpunkt (PD 35, 75 Tage) wurden maximal 9 % aberrante Metaphasen in der Population festgestellt,

gefolgt von einem Rückgang auf 1 % (PD 42, 115 Tage) vor dem Erreichen der Seneszenz. Die mFISH-Analyse der AG1522D-Zellen zu diesem Zeitpunkt (PD 42, 115 Tage) zeigte einen vergleichbaren Wert von 4 % aberranten Metaphasen. Die beobachteten Aberrationen waren für beide Methoden Chromosomen- und Chromatidbrüche und die mFISH-Analyse zeigte keine Translokationen oder klonale Aberrationen. Es trat im Mittel eine Aberration pro aberranter Metaphase auf. Numerische Aberrationen (Tetraploidie, Aneuploidie) wurden über die gesamte Kultivierungsdauer nur in maximal 5 % der analysierten Metaphasen festgestellt (nicht gezeigt).

### 3.1.3.3 Langzeitentwicklung der Proteinexpression in AG1522D-Zellen

Die Langzeitentwicklung der Proteinexpression in AG1522D-Zellen ist anhand eines repräsentativen Western-Blots in Abbildung 3.22 für eine frühen, mittleren und späten Zeitpunkt der Kultivierung dargestellt.

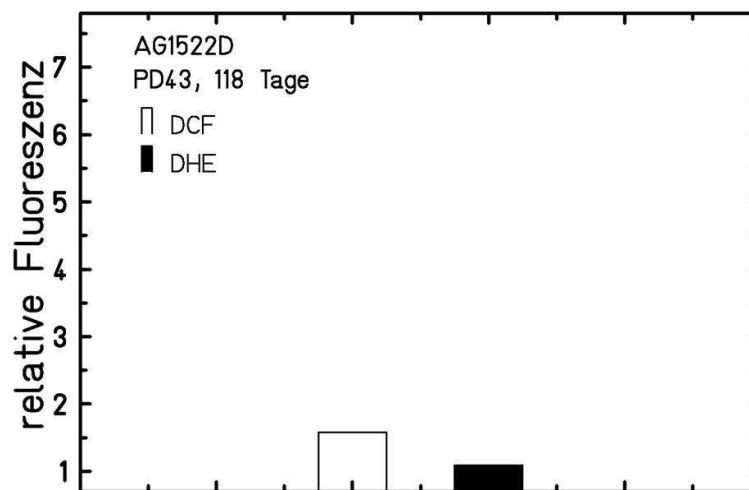


**Abbildung 3.22:** Repräsentativer Western-Blot der Proteinexpression bzw. -akkumulation in AG1522D-Zellen von (a) p53, Cyclin D1 und p21 (n = 2) sowie (b) PCNA und p16 (n = 3) zu repräsentativen Zeitpunkten der Langzeitkultivierung. Tubulin wurde zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge detektiert. (n = Anzahl der Aufträge).

Für p53 wurde in direkter zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz (PD 42, 112 Tage) eine Akkumulation der zellulären Mengen, gefolgt von einer Abnahme in seneszenten Zellen (PD 45, 195 Tage) beobachtet. Die zeitliche Änderung der zellulären Mengen des CDK-Inhibitors p21 war vergleichbar, aber die Änderung des Expressionsniveaus etwas deutlicher. Die zellulären Proteinmengen des Cyclin D1 nahmen mit zunehmendem Alter der Population zu. Die Expression des Replikationskofaktors PCNA, einem Proliferationsmarker, ging nach dem Erreichen der Seneszenz deutlich zurück (PD 45, 195 Tage). Zeitgleich wurde eine stark erhöhte Expression von p16 in den seneszenten Zellen festgestellt.

#### 3.1.3.4 ROS-Akkumulation in AG1522D-Zellen

Eine alterungsbedingte ROS-Akkumulation in AG1522D-Zellen wurde durch Oxidation der Fluorochrome DCFH-DA und DHE im Verhältnis zu jungen Zellen (PD 30, 30 Tage) für einen Zeitpunkt kurz vor Erreichen der replikativen Seneszenz (PD 43/ 118 Tage) bestimmt. Wie in Abbildung 3.23 dargestellt, wurde eine im Vergleich zu jungen Zellen 1,6-fach erhöhte Fluoreszenzintensität für DCF beobachtet. Die DHE-Fluoreszenz gealterter AG1522D-Zellen zeigte keinen Unterschied zu jungen Zellen.



**Abbildung 3.23:** ROS-Akkumulation in AG1522D-Zellen zu einem späten Zeitpunkt der Kultivierung (PD 43, 118 Tage), ermittelt durch durchflusszytometrische Messung der DCF- und DHE-Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zu jungen AG1522D-Zellen (PD 30, 30 Tage). (n = 1, n = Anzahl Proben).

#### Zusammenfassung der Langzeitentwicklung von AG1522D-Zellen

Während der Langzeitentwicklung von AG1522D-Zellen wurden über die gesamte Kultivierungsdauer maximal 9 % aberrante Metaphasen beobachtet. Transmissible und klonale Aberrationen traten nicht auf. Der Rückgang der Proliferation ging mit einer Akkumulation und stärkeren Expression der Zellzyklusregulierenden Proteine p53, p21 und p16, wie auch Cyclin D1, und der rückläufigen Expression des Proliferationsmarkers PCNA einher. Kurz vor dem Erreichen der Seneszenz wurde bezüglich der ROS-Akkumulation eine 1,6-fach erhöhte DCF-Fluoreszenz festgestellt.

### **Zusammenfassung der Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten**

Während der Langzeitkultivierung von 3 Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90, AG1522D), die aus 3 unterschiedlichen Ursprungsgeweben (Haut, Lunge, Vorhaut) stammen, wurde in verschiedenen Experimenten nach einer ersten teilungsaktiven Phase ein kontinuierlicher Rückgang der Proliferationsaktivität über die Kultivierungsdauer beobachtet. Es zeigten sich Unterschiede im Proliferationsverhalten sowohl zwischen den Fibroblastenlinien, wie auch zwischen Experimenten der einzelnen Linien. Dies bezog sich auf die Dauer der Phase aktiver Proliferation und die erreichten PDs. In Experimenten mit zwei Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90) kam es zur Akkumulation instabiler chromosomaler Aberrationen und teilweise zu einer Expansion von Zellen mit klonalen strukturellen oder numerischen Aberrationen. In einem Experiment der NHDF-Zellen kam es neben einer klonal expandierenden Duplikation chromosomalen Materials von Chromosom 17 zu Monosomien, insbesondere für Chromosom 6, die im Zusammenhang mit einer verlängerten replikativen Lebensspanne der Zellen stehen. In IMR-90-Zellen traten in zwei Experimenten vergleichbare klonale Aberrationen auf, die Duplikationen chromosomalen Materials verschiedener Donor-Chromosomen an der Telomerregion des q-Arms eines der homologen Chromosomen 9 darstellen. Trotz der teilweise verlängerten replikativen Lebensspanne von NHDF-Zellen wurde die replikative Seneszenz aber in allen Fibroblastenlinien erreicht. Entsprechend kam es zu einer Akkumulation, bzw. erhöhten Expression zellzyklusinhibierender Proteine. Die Proteinexpressionsmuster unterschieden sich allerdings zwischen den Fibroblastenlinien bzgl. der Expressions- bzw. Akkumulationsniveaus der verschiedenen Zellzyklusinhibitoren und deren zeitlichem Auftreten. Allgemein wurde für p53 und p21 mit dem Eintritt in die Seneszenz eine Akkumulation, bzw. erhöhte Expression festgestellt. In dermalen Fibroblasten konnte p53 nicht detektiert werden. Die p16-Expression stieg dagegen deutlich nach Eintritt der Fibroblasten in die replikative Seneszenz an. In NHDF-Zellen wurden Unterschiede in der Proteinexpression zwischen Experiment 1a, einhergehend mit klonalen zytogenetischen Veränderungen im Vergleich zu den Experimenten 2 und 3 beobachtet. Alle seneszenten Fibroblastenpopulationen zeigten mindestens 1,5-fach erhöhte intrazelluläre ROS-Mengen im Vergleich zu jungen Zellen.

#### 3.2 Langzeitentwicklung in Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

Im folgenden Teil wurden die Auswirkungen einer Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit dünn- oder dichtenionisierender Strahlung auf die genomische Stabilität in den direkten Nachkommen bestrahlter normaler humaner Fibroblasten in Kolonien klonogenen Ursprungs untersucht, um Populationsdynamiken und Selektionsvorteile, die bei Massenkultivierungen auftreten (Rubin 1997) und besonders bei Massenkulturen bestrahlter Zellen zum tragen kommen (Winter 2007), zu verhindern. Durch die Analyse klonogener Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen in Kolonien ist ein quantitativer Vergleich der untersuchten Strahlenqualitäten im Gegensatz zu Massenkulturen nicht möglich. Mit dieser Methode kann nur eine qualitative Aussage unter Ausschluss der Selektion von Zellen in Massenkulturen getroffen werden. Für eine Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u, 290 keV/μm] wurde die an der GSI vorhandene Mikrosonde genutzt. Mit dieser wurden alle der untersuchten Einzelzellen, bzw. deren Zellkerne, mit einer definierten Anzahl von einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlt. Im Gegensatz zu „broadbeam“ Experimenten wird dadurch eine makroskopisch homogene Bestrahlung aller Zellen gewährleistet. Die Nachkommen der so bestrahlten Zellen wurden in Kolonien aus Einzelzellen oder in Massenkulturen aus 800-1000 bestrahlten Einzelzellen untersucht.

Die Experimente wurden mit AG1522D-Zellen durchgeführt, da diese in vorangegangenen Untersuchungen verschiedener nicht-bestrahlter humaner Fibroblastenlinien keine genomische Instabilität, eine für Fibroblasten zu erwartende Langzeitentwicklung zellzyklus-relevanter Proteine und eine relativ schwache Akkumulation von ROS über die Kultivierungsdauer zeigten (siehe Abschnitt 3.1.3).

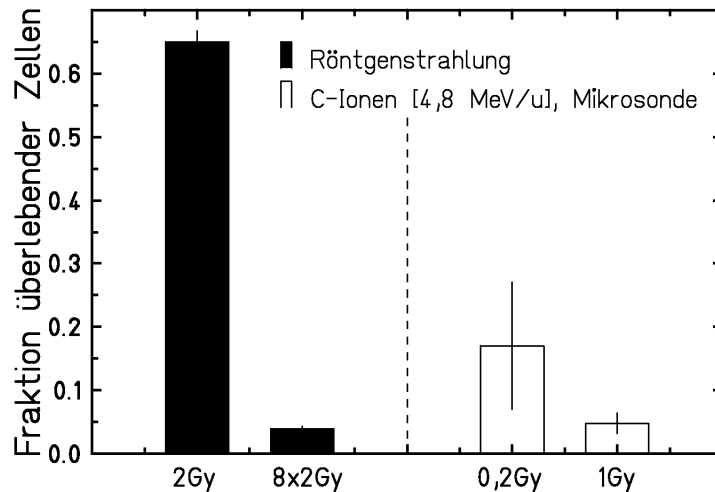
##### 3.2.1 Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen

Das klonogene Zellüberleben wurde nach einer Bestrahlung von Massenkulturen mit Röntgenstrahlung sowie einer gezielten Bestrahlung von Einzelzellen mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestimmt. Die Massenkulturen wurden mit einer einmaligen Dosis von 2 Gy und einer hohen Dosis von 16 Gy Röntgenstrahlung, fraktioniert in 8 täglichen Dosen à 2 Gy, bestrahlt. Die Dosen von 2 und 8x2 Gy wurden aufgrund der Beobachtungen bezüglich zytogenetischer Veränderungen bestrahlter Zellen in vorangegangenen Experimenten mit Massenkulturen gewählt (Zahnreich *et al.* 2010, Zahnreich 2007). Für eine gezielte Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] an der Mikrosonde wurden einzelne Zellen mit einem oder fünf Ionendurchgängen pro Zellkern bestrahlt. Dies entspricht Dosen von 0,2 Gy und 1 Gy. Nach



### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

der jeweiligen Bestrahlung wurden die Zellen vor einer Neuaussaat 24 h inkubiert, da diese Zeitspanne für eine Reparatur, bzw. Prozessierung der strahleninduzierten DNA-Schäden benötigt wird (Asaithamby *et al.* 2008, Iliakis *et al.* 2004) und daraus ein höheres zelluläres Überleben resultiert. Die Ergebnisse des relativen klonogenen Zellüberlebens, normiert auf die jeweiligen Kontrollen, sind in Abbildung 3.24 dargestellt.



**Abbildung 3.24:** Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u]. Es wurde mit einer akuten Röntgendosis von 2 Gy sowie mit einer täglich fraktionierten Dosis von 8x2 Gy oder gezielt mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] pro Zellkern bestrahlt. Die Zellen wurden in allen Experimenten 24 h nach der Bestrahlung ausgesät. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Das Zellüberleben ging für beide Strahlenqualitäten in Abhängigkeit der Höhe der Dosis zurück. Nach der Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit einer Röntgendosis von einmalig 2 Gy lag das relative Zellüberleben bei 65 % und einer täglich fraktionierten Bestrahlung mit 8x2 Gy Röntgenstrahlung nur noch bei 3,9 %. Nach der Bestrahlung von Einzelzellen mit einer definierten Anzahl an Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] mittels der Mikrosonde war das Zellüberleben demgegenüber deutlich niedriger. Das mittlere relative Zellüberleben lag bei einer Bestrahlung mit einem Ion pro Zellkern (0,2 Gy) bei 17 % und bei 5 Ionen pro Zellkern (1 Gy) nur noch bei 5 %.

#### 3.2.2 Zytogenetische Veränderungen in Kolonien schein-bestrahlter Fibroblasten

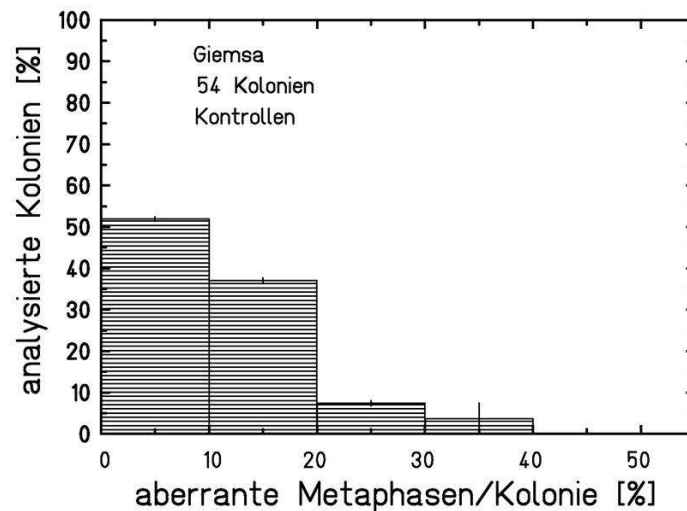
Zu Beginn werden die zytogenetischen Veränderungen in den Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter Fibroblasten betrachtet, die als Kontrollen zu den Bestrahlungsexperimenten mitgeführt wurden. Die Kontrollen aller Experimente (5) nach Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] an der Mikrosonde werden hier zusammen behandelt, da sich trotz unterschiedlicher experimenteller Bedingungen (siehe Ab-

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

schnitt 2.2) keine Unterschiede in den Ergebnissen der zytogenetischen Analysen schein-bestrahlter Zellen zeigten.

In Abbildung 3.25 sind die Fraktionen aberranter Metaphasen in Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter Zellen aus Giemsa-Analysen aller Experimente dargestellt.

Zwecks einer besseren Übersichtlichkeit wurden die Anteile aberranter Metaphasen pro analysierter Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10%-Punkten gruppiert und sind als Anteile aller analysierten Kolonien gezeigt.

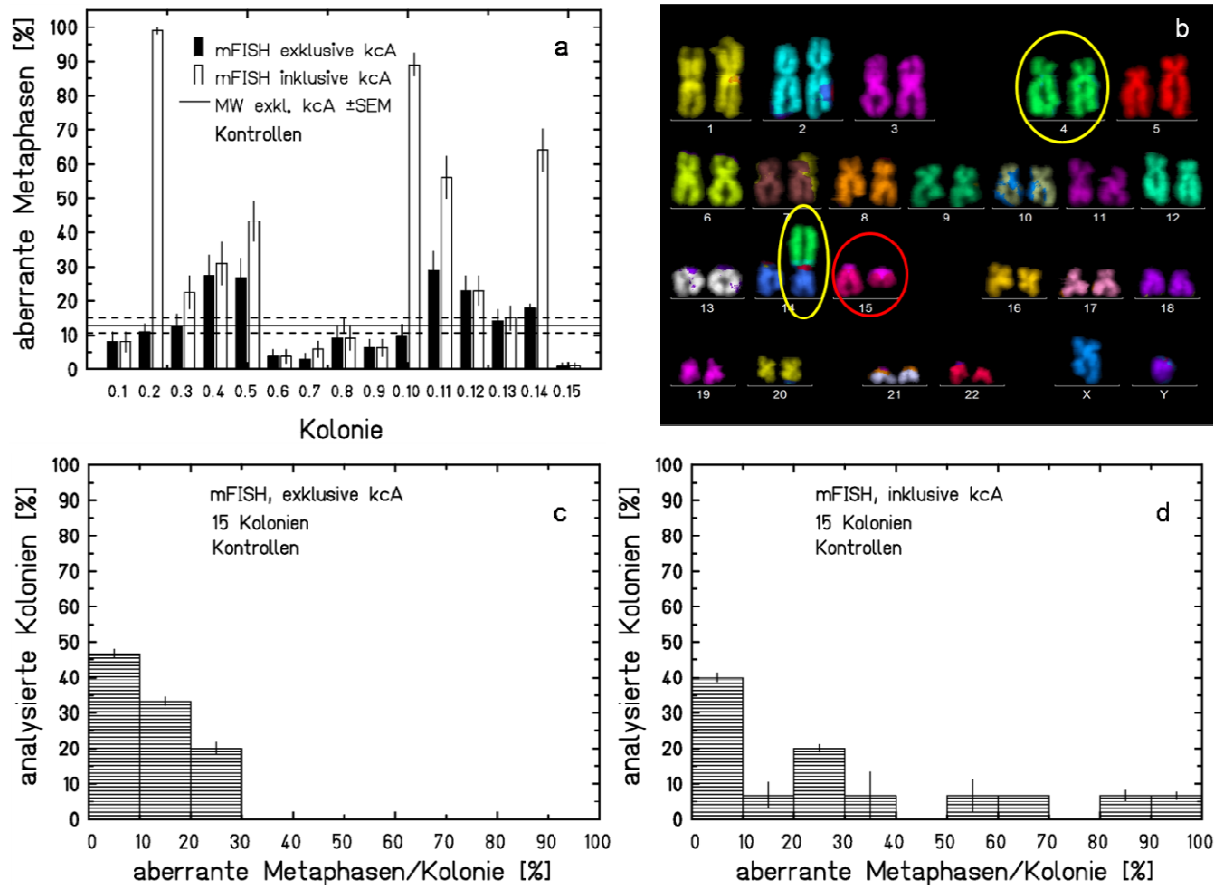


**Abbildung 3.25:** Ergebnisse der Giemsa-Analysen chromosomaler Aberrationen von 54 Kolonien schein-bestrahlter Zellen für die Anteile aberranter Metaphasen pro analysierter Kolonie. Zwecks Übersichtlichkeit wurden die Fraktionen aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Insgesamt wurden 54 Kolonien schein-bestrahlter Zellen mit der Giemsa-Methode analysiert. 50 % der analysierten Kolonien zeigten in keiner bis maximal 10 % der analysierten Metaphasen pro Kolonie strukturelle Aberrationen, wobei nur in 6 % der Kolonien keine Aberrationen beobachtet wurden. Eine höhere Zahl aberranter Metaphasen pro Kolonie (11-20 %) wurde in 37 % der Kolonien beobachtet. Dieses Niveau wurde nur in 7 % der Kolonien überschritten. Für alle analysierten Kolonien wurde ein mittlerer Wert aberranter Metaphasen pro Kolonie von 11 % ( $\pm 1,2$ ) bestimmt. Die in den Kolonien schein-bestrahlter Zellen am häufigsten auftretenden Aberrationstypen waren Chromatidbrüche, Chromosomenbrüche und dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Diese traten meist zu gleichen Teilen auf. Kam es in Kolonien zu höheren Aberrationsraten, wurde ein höherer Anteil von Chromatidbrüchen und dizentrischen Chromosomen ohne azentrische Fragmente in den aberranten Zellen beobachtet.

mFISH-Analysen wurden für 15 schein-bestrahlte Kolonien durchgeführt. Die Ergebnisse sind Abbildung 3.26 dargestellt.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.26:** Ergebnisse der mFISH-Analysen chromosomaler Aberrationen 15 schein-bestrahlter Kolonien. Jede klonale chromosomale Aberration (kcA) wurde nur als eine sporadische Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“) oder als eigenständige Aberration und damit mehrfach gewertet („inklusive kcA“). (a) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie in 15 analysierten Kontrollkolonien. Der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler, SEM) aberranter Metaphasen für sporadische Aberrationen („exklusive kcA“) aller analysierten Kolonien ist angegeben. (b) mFISH gefärbter Karyotyp der Kolonie 0.10 mit der klonalen Aberration (15'T), die in 98 % der analysierten Metaphasen auftrat sowie zusätzlich mit der subklonalen Aberration (14'-4) in 3 % aller Metaphasen. Keines der homologen Chromosomen 4 zeigten eine Deletion des translozierten Fragments von Chromosom 4 der klonalen Aberration (14'-4). (c) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie ohne klonale Aberrationen (exklusive kcA“) und (d) mit klonalen Aberrationen („inklusive kcA“), wobei die Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Bei mFISH-Analysen wurde die Klonalität chromosomaler Aberrationen berücksichtigt. Es wurden daher entweder nur sporadische Aberrationen („exklusive kcA“) betrachtet oder alle klonalen Aberrationen in die Auswertung einbezogen („inklusive kcA“). Ferner wurden zwecks Übersichtlichkeit, wie bereits für Giemsa-Analysen beschrieben, in den Abbildungen 3.26c und d die Anteile aberranter Metaphasen je analysierter Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert und als Anteile aller analysierten Kolonien dargestellt. Die anteilig größte Fraktion analysierter Kolonien (45 %) zeigte bis zu 10 % aberrante Metaphasen je analysierter Kolonie. Ein vergleichbarer Anteil von Zellen (34 %) lag in einem Bereich von 11-20 % aberranter Metaphasen pro Kolonie und 20 % der Kolonien zeigten bis maximal 30 % aberrante Metaphasen pro Kolonie. Der mittlere Anteil aberranter Zellen je

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

analysierte Kolonie lag für die mFISH-Analyse bei 13 % ( $\pm 2,2$ ). Für die Betrachtung rein sporadischer Aberrationen lagen die Anteile aberranter Metaphasen von 33 % der analysierten Kolonien schein-bestrahlter Zellen über diesem Wert (Abbildung 3.26a). In 60 % aller Kolonien schein-bestrahlter Zellen traten zusätzlich klonale Aberrationen auf. Die häufigsten sporadischen strukturellen Aberrationen in allen schein-bestrahlten Kolonien aus mFISH-Analysen waren, wie bereits in Giemsa-Analysen festgestellt, Chromosomen- und Chromatidbrüche sowie dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Sporadische Translokationen traten in 1-5 % der analysierten Metaphasen pro Kolonie auf.

Wie aus Abbildung 3.26a hervorgeht, traten in 60 % der schein-bestrahlten Kolonien Zellen mit klonalen Aberrationen auf, die in 4 Kolonien (0.2, 0.10, 0.11 und 0.14) besonders deutlich expandierten. Wurde diese klonale Expansion berücksichtigt, kam es zu einem mindestens 2-fachen Anstieg der Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie. Alle in schein-bestrahlten Kolonien aufgetretenen klonale Aberrationen sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

**Tabelle 3.3:** Klonale Aberrationen in Kolonien schein-bestrahlter Zellen. Der prozentuale Anteil der Zellen mit klonalen Aberrationen an der Gesamtzahl der analysierten Metaphasen pro Kolonie ist angegeben.

Kolonie (schein-bestrahlt)	Klonale Aberrationen [%]			
0.2	(2'-4) [99%]			
0.3	(13'-9) [8%]			
0.4	(14'p-1) [3%]			
0.5	(2'-2) [20%]	(1'-7) (2'-1) [10%]		
0.7	(14'p-14) [2%]	(14'p-4) [3%]		
0.10	(15'T) [98%]	(15'T) (14'p-4) [3%]	(15'T) (14'p-5) [5%]	(15'T) (14'p-10) [2%]
0.11	(2'-12) [30%]	(2'-8) [3%]	(2'-15) [3%]	
0.13	(14'p-16) [2%]			
0.14	(2'-2) [54%]	(2'-4) [5%]		

In den Kolonien 0.2 und 0.10 kam es zu einer deutlichen klonalen Expansion von Zellen mit einer Translokation (2'-4) bzw. einer terminalen Deletion (15'T), und zwar in bis zu 99 % bzw.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

98 % der analysierten Metaphasen. Ein mFISH gefärbter Karyotyp einer Metaphase der Kolonie 0.10 mit einem trunkierten Chromosom 15 (15'T) und einer zusätzlichen subklonalen Aberration (14'-4) ist in Abbildung 3.26b dargestellt. In über der Hälfte der schein-bestrahlten Kolonien mit klonalen Aberrationen traten mehrere klonale Aberrationen auf, die allerdings meist nur schwach in den analysierten Metaphasen expandierten. Auffällig war dabei eine häufige Beteiligung der Chromosomen 2 und 14. Chromosom 14 war an allen Aberrationen mit dem p-Arm beteiligt. Kam es zur Translokation größerer Fragmente anderer Chromosomen an den p-Arm von Chromosom 14, liegen Hinweise auf Duplikationen dieses chromosomalen Materials in den Metaphasen vor (Abbildung 3.26b). In einer Kolonie (0.5) kam es zu einer klonalen Expansion einer komplexen Aberration (1'-7) (2'-1) in 10 % der analysierten Metaphasen.

Wurden klonale Aberrationen in die Analysen miteinbezogen, kam es zu einer deutlichen Zunahme von Kolonien mit anteilig mehr aberranten Metaphasen pro analysierter Kolonie (Abbildung 3.26c). Der mittlere Wert der Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie stieg auf 31 % ( $\pm 8$ ).

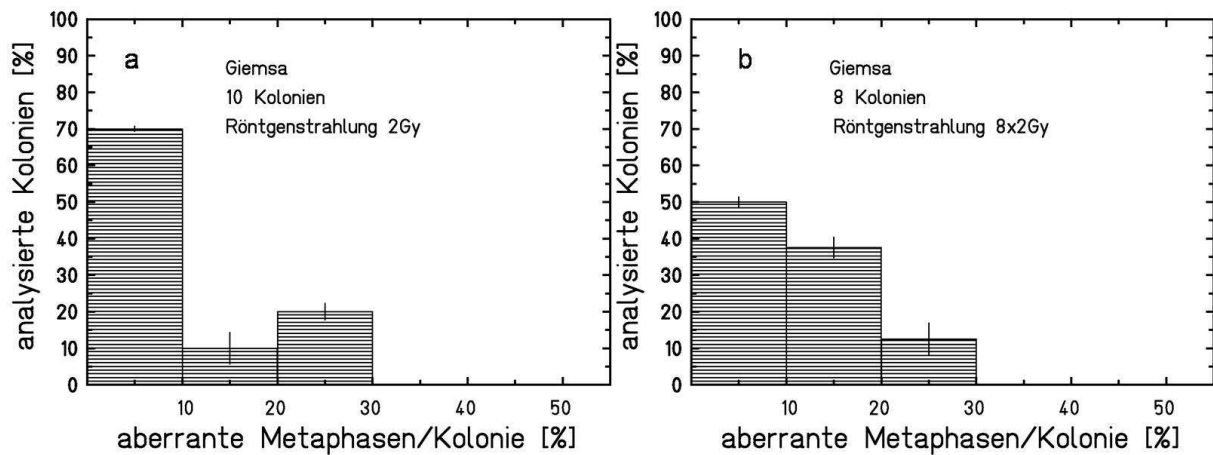
#### **Zusammenfassung zytogenetischer Veränderungen der Nachkommen schein-bestrahlter Fibroblasten in Kolonien**

In schein-bestrahlten AG1522D-Zellen wurden Kolonien mit aberranten Metaphasen anhand von Giemsa- und mFISH-Analysen beobachtet. Die für beide Methoden am häufigsten beobachteten instabilen Aberrationstypen waren Chromosomen- und Chromatidbrüche sowie dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Mittels der mFISH-Methode wurden sporadische Translokationen in 1-5 % der Zellen je analysierter Kolonie festgestellt, die in 60 % der Kolonien klonal expandierten. Dabei wurden ähnliche Translokationsmuster in allen Kolonien bezüglich der beteiligten Chromosomen (2 und 14) beobachtet.

#### **3.2.3 Zytogenetische Veränderungen in Kolonien der Nachkommen mit Röntgenstrahlung bestrahlten Fibroblasten**

Die Ursprungszellen der im folgenden Abschnitt behandelten Kolonien wurden mit Dosen von einmalig 2 Gy oder einer fraktionierten täglichen Dosis von 8x2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt. In Abbildung 3.27 sind die Ergebnisse der Giemsa-Analysen der Kolonien dargestellt und, wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, zusammengefasst.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.27:** Ergebnisse der Giemsa-Analysen chromosomaler Aberrationen in Kolonien mit Röntgenstrahlung bestrahlter Fibroblasten. Anteile analysierter Kolonien mit Fraktionen aberranter Metaphasen pro analysierte Kolonie nach (a) einmaliger Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy und (b) Bestrahlung mit einer täglich fraktionierten Dosis von 8x2 Gy. Zwecks Übersichtlichkeit wurden die Fraktionen aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

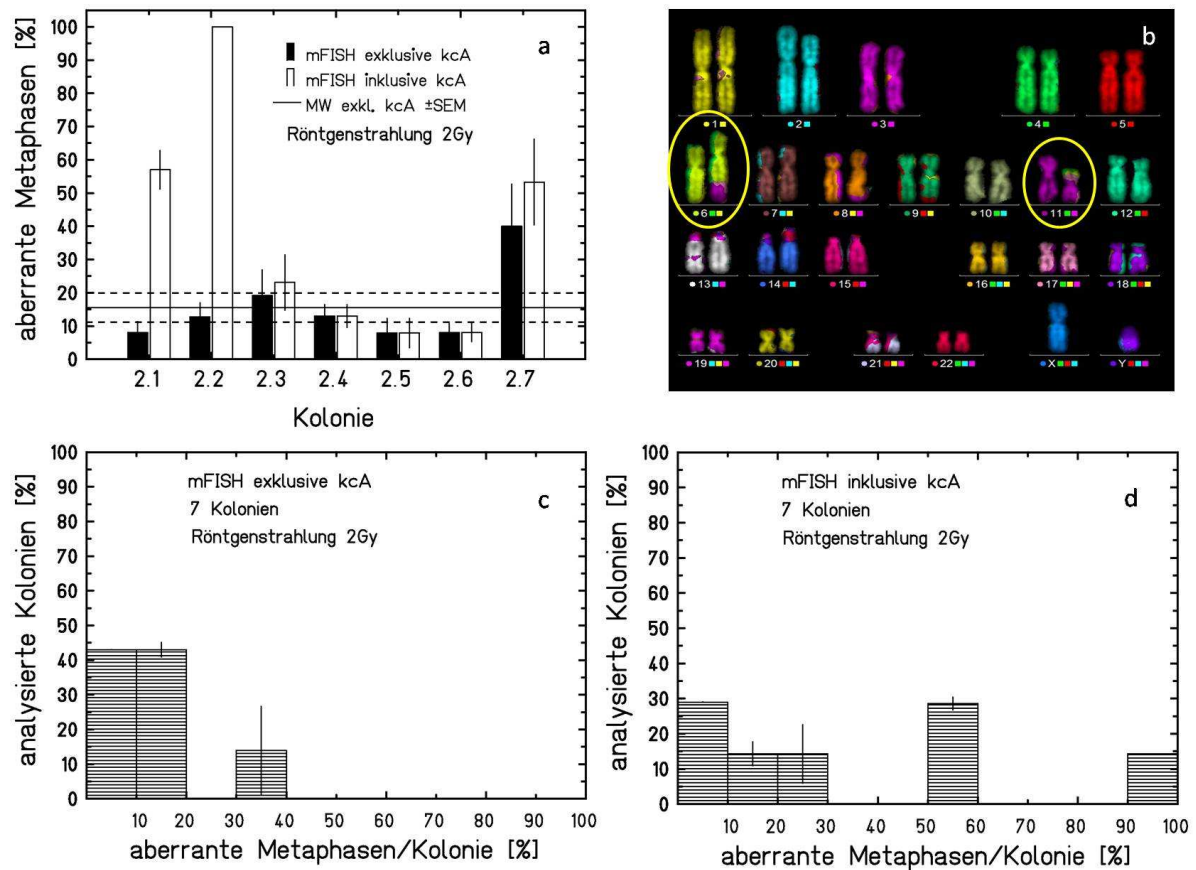
Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung wurden Metaphasen von 10 Kolonien mit der Giemsa-Methode analysiert. In 70 % dieser Kolonien wurden bis zu 10 % aberrante Metaphasen pro Kolonie beobachtet (Abbildung 3.27a). Nur 10 % der analysierten Kolonien zeigten höhere Anteile aberranter Metaphasen von 11-20 %. In 20 % der analysierten Kolonien wurden 21-30 % aberrante Metaphasen beobachtet. Es ergab sich ein mittlerer Anteil von 11,2 % ( $\pm 2,1$ ) aberranter Metaphasen pro Kolonie.

Die Ergebnisse der Giemsa-Analysen für 8 Kolonien ursprünglich mit 8x2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen sind in Abbildung 3.27b dargestellt. 50 % der Kolonien zeigten eine niedrige Aberrationsrate von maximal 10 % aberranter Metaphasen pro Kolonie. In einem vergleichbaren Anteil der Kolonien von 40 % wurden 11-20 % aberrante Metaphasen pro Kolonie und in einer Kolonie 21-30 % aberrante Metaphasen beobachtet. Es ergab sich ein mittlerer Wert aberranter Metaphasen pro Kolonie von 11,4 % ( $\pm 2,8$ ).

Die in den Nachkommen der mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen in Kolonien am häufigsten vorkommenden Aberrationstypen waren Chromosomen- und Chromatidbrüche sowie dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente.

mFISH-Analysen wurden für je 7 Kolonien der mit 2 oder 8x2 Gy bestrahlten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Nachkommen ursprünglich mit einer Röntgendosis von 2 Gy bestrahlten Zellen sind Abbildung 3.28 dargestellt und, wie bereits in Abschnitt 3.2.2 für scheinbestrahlte Zellen beschrieben, zusammengefasst.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.28:** Ergebnisse der mFISH-Analysen chromosomaler Aberrationen von 7 Kolonien ursprünglich mit einer Röntgendosis von 2 Gy bestrahlten Zellen. Jede klonale chromosomale Aberration wurde nur als eine sporadische Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“) oder als eigenständige Aberration („inklusive kcA“) und damit mehrfach gewertet. (a) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie. Der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler, SEM) aberranter Metaphasen für sporadische Aberrationen („exklusive kcA“) aller analysierten Kolonien ist angegeben. (b) mFISH gefärbter Karyotyp der Kolonie 2.2 mit der klonalen reziproken Translokation (6'-11) (11'-6), die in 100 % der analysierten Metaphasen auftrat. (c) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie ohne klonale Aberrationen (exklusive kcA) und (d) mit klonalen Aberrationen („inklusive kcA“), wobei die Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Analysen sporadischer Aberrationen in den Kolonien der Nachkommen von Zellen, die mit einer Röntgendosis von 2 Gy bestrahlt wurden, zeigten in jeweils 43 % der Kolonien bis 10 % sowie 11-20 % aberrante Metaphasen pro Kolonie (Abbildung 3.28c). In 14 % der Kolonien wurde ein höherer Anteil von Zellen mit 30-40 % aberranten Metaphasen pro Kolonie beobachtet. Es ergab sich ein mittlerer Wert von 15,5 % ( $\pm$  4,4) aberranten Metaphasen je analysierter Kolonie in den direkten Nachkommen der mit einer Dosis von 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen aus den mFISH-Analysen. Nur eine der analysierten Kolonien (2.7) zeigte höhere Anteile aberranter Metaphasen mit sporadischen Aberrationen, die deutlich über dem Mittelwert aller analysierten Kolonien lagen (Abbildung 3.28a). In dieser Kolonie kam es ebenfalls zur schwachen Expansion von Zellen mit klonalen Aberrationen.

Wie aus Abbildung 3.28a hervorgeht, kam es in 57 % der analysierten Kolonien zur Expansion von Zellen mit klonalen Aberrationen. In den Nachkommen der mit 2 Gy Röntgenstrahlung

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

lung bestrahlten Zellen trat in einer Kolonie (2.2) eine einfache vollständige Translokation (6'-11) (11'-6) in 100 % der analysierten Metaphasen auf. Der mFISH-gefärbte Karyotyp einer Metaphase der Kolonie 2.2 ist in Abbildung 3.28b dargestellt. Alle aufgetretenen klonalen Aberrationen sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

**Tabelle 3.4:** Klonale Aberrationen in Kolonien aller mit ursprünglich 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen. Der prozentuale Anteil der Zellen mit klonalen Aberrationen an der Gesamtzahl der analysierten Metaphasen pro Kolonie ist angegeben. Aberrationen, die in 100 % der analysierten Metaphasen einer Kolonie detektiert wurden, sind rot hervorgehoben.

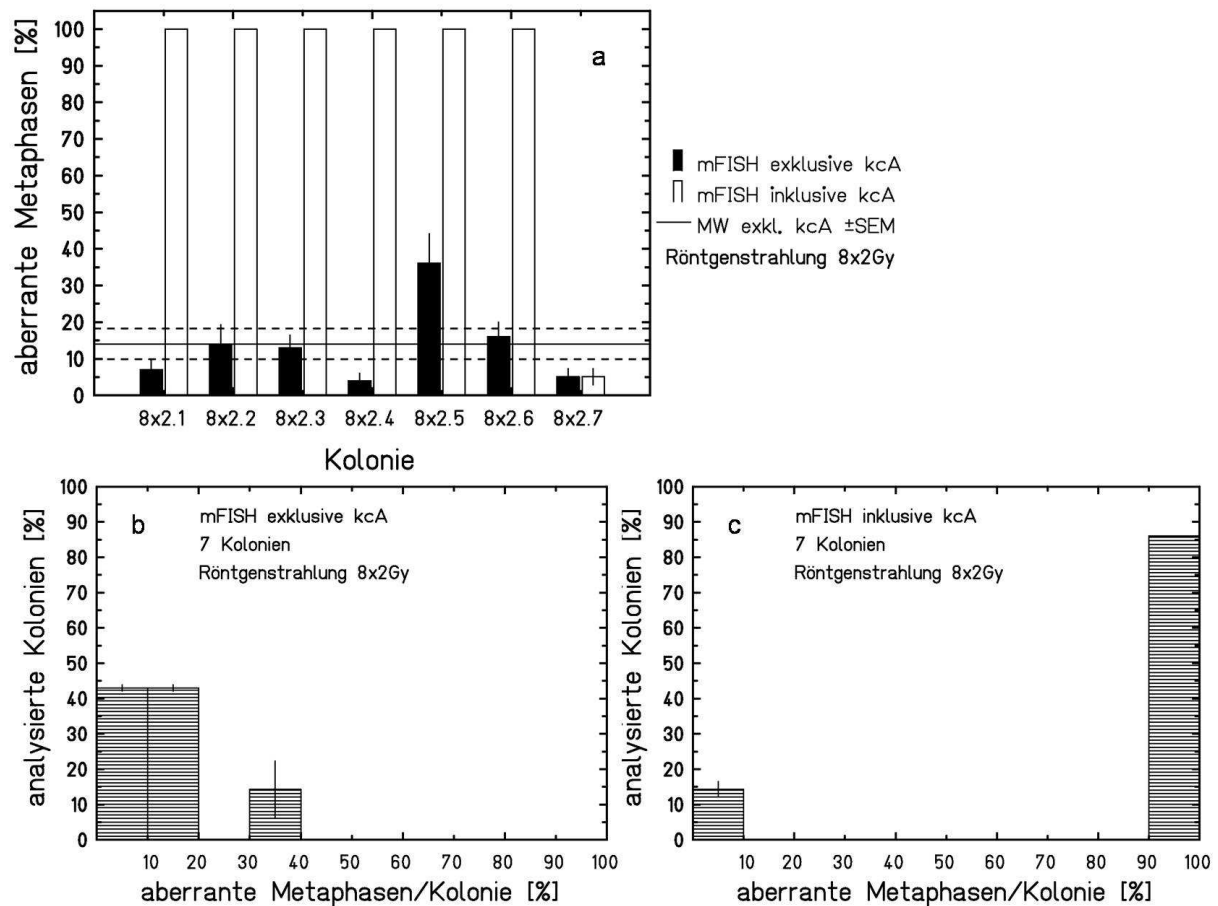
Kolonie	Klonale Aberrationen [%]	
2.1	(14'p-2) [51%]	(14'p-19) [4%]
2.2	(6'-11) (11'-6) [100%]	
2.3	(14'p-2) [8%]	
2.7	(14'-14) (18'-17) [13,3%]	(14'-18) [13,3%]

Neben den klonalen Aberrationen, die in 100 % der Metaphasen einer Kolonie vorhanden waren, traten weitere klonale Aberrationen in niedrigeren Anteilen der analysierten Metaphasen auf. Auffällig war eine Beteiligung von Chromosom 14 an 70 % der klonalen Translokationen. Wurden klonale Aberrationen in die Auswertung einbezogen, stieg der mittlere Anteil aberranter Zellen pro Kolonie auf über das doppelte an (37,4 %  $\pm$  13, Abbildung 3.28c).

In Abbildung 3.29 sind Ergebnisse der mFISH-Analysen der Kolonien der direkten Nachkommen von Zellen, die mit einer täglich fraktionierten Röntgendosis von 8x2 Gy bestrahlt wurden, dargestellt.



### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.29:** Ergebnisse der mFISH-Analysen chromosomaler Aberrationen von 7 Kolonien der Zellen, die mit einer täglich fraktionierten Dosis von 8x2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt wurden. Jede klonale chromosomale Aberration wurde nur als eine sporadische Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“) oder als eigenständige Aberration und damit mehrfach gewertet („inklusive kcA“). (a) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie. Der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler, SEM) aberranter Metaphasen für sporadische Aberrationen („exklusive kcA“) der analysierten Kolonien ist angegeben. (b) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie ohne klonale Aberrationen (exklusive kcA“) und (c) mit klonalen Aberrationen („inklusive kcA“), wobei die Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Abbildung 3.29a zeigt die Anteile aberranter Metaphasen der analysierten Kolonien. Im Mittel zeigte jede analysierte Kolonie, die aus einer mit einer fraktionierten Röntgendosis von 8x2 Gy bestrahlten Zelle hervorging, einen Anteil von 14 % ( $\pm$  4,1) Metaphasen mit sporadischen Aberrationen („exklusive kcA“). Nur eine der analysierten Kolonien (8x2.5) überschritt den Mittelwert aller analysierten Kolonien. In 85 % der Kolonien kam es zu klonalen Aberrationen, die in 100 % der analysierten Metaphasen der jeweiligen Kolonien vorhanden waren. In Tabelle 3.5 sind alle klonalen Aberrationen in den Nachkommen der ursprünglich mit einer fraktionierten Röntgendosis von 8x2 Gy bestrahlten Zellen aufgeführt.

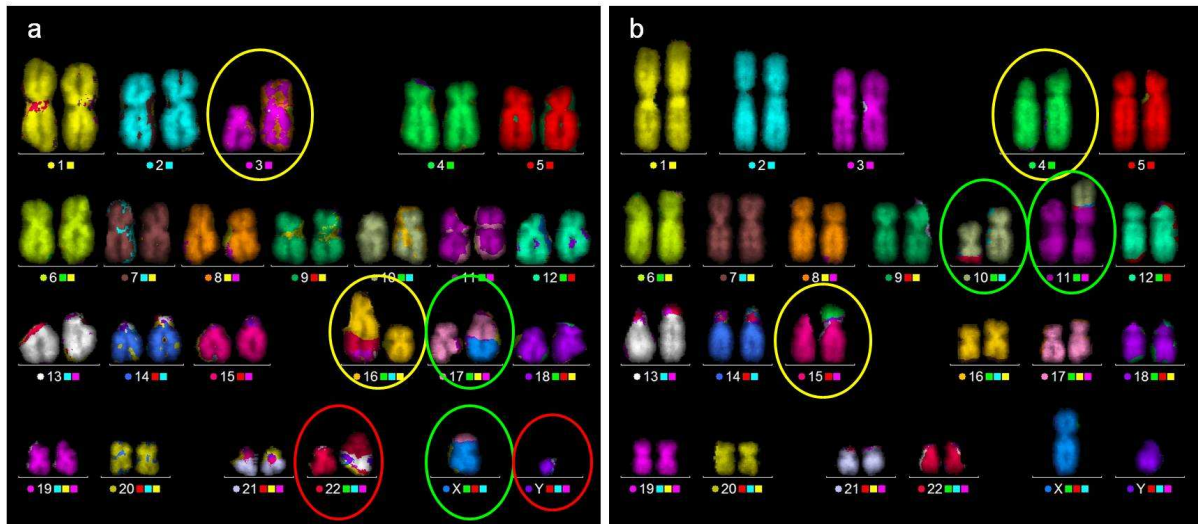
### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

**Tabelle 3.5:** Klonale Aberrationen in Kolonien ursprünglich mit einer fraktionierten Bestrahlung von Röntgenstrahlung á 8x2 Gy bestrahlten Zellen. Der prozentuale Anteil der Zellen mit klonalen Aberrationen an der Gesamtzahl der analysierten Metaphasen pro Kolonie ist angegeben. Aberrationen, die in 100 % der analysierten Metaphasen einer Kolonie detektiert wurden, sind rot hervorgehoben.

Kolonie	Klonale Aberrationen [%]					
8x2.1	(16'-3) (3'T) (22'-Y) (Y'T) (17'-X) (X'-17) [100%]					
8x2.2	(5'-20) (10'-X) (X'T) [47%]	(5'-20) (10'-X) (X'T) (14'p-12) [53%]				
8x2.3	(4'-9) (9'-4) [100%]					
8x2.4	(1'-17) (17'-1) [100%]					
8x2.5	(11'-15) (15'-11) (17'-15-17) (15'T) [89%]	(11'-15) (15'-11) (17'-15-17) (15'T) (14'p-16) [11%]				
8x2.6	(15'-4) (4'T) (10'-11) (11'-10) [65%]	(15'-4) (4'T) (10'-11) (11'-10) (13'q-9) [6%]	(15'-4) (4'T) (10'-11) (11'-10) (13'T) [9%]	(15'-4) (4'T) (10'-11) (11'-10) (13'q-22) [10%]	(15'-4) (4'T) (10'-11) (11'-10) (13'q-20) [5%]	(15'-4) (4'T) (10'-11) (11'-10) (13'-13) [4%]

In 30 % der Kolonien (8x2.3 und 8x2.4) trat jeweils in 100 % der analysierten Metaphasen eine einfache oder vollständige Translokation auf. In den anderen Kolonien mit klonalen Aberrationen in 100 % der analysierten Metaphasen traten zwei, bzw. in einem Fall (8x2.1) drei Translokationen pro Metaphase, und in einer Kolonie (8x2.5) zusätzlich eine komplexe transmissible Aberrationen in Form einer Insertion auf. mFISH gefärbte Karyotypen der Kolonien 8x2.1 und 8x2.6 mit Translokationen, die in 100 % der analysierten Metaphasen vorhanden waren, sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.30:** mFISH-gefärbte Karyotypen der Kolonien (a) 8x2.1 mit den 3 Translokationen (16'-3) (3'T), (22'-Y) (Y'T) und (17'-X) (X'-17) sowie (b) 8x2.6 mit den 2 Translokationen (15'-4) (4'T) und (10'-11) (11'-10). Die Aberrationen waren in beiden Kolonien jeweils in 100 % der analysierten Metaphasen vorhanden.

In 50 % der Kolonien, in denen eine klonale Aberration in allen Zellen auftrat, kam es zusätzlich zu weiteren klonalen Aberrationen, die in weniger als 100 % der analysierten Metaphasen vorhanden waren. An diesen waren die Chromosomen 13 und 14 sehr häufig beteiligt.

Wurden bei der mFISH-Auswertung die Expansion klonaler Aberrationen berücksichtigt, stiegen die Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie deutlich auf einen mittleren Wert aberranter Metaphasen pro Kolonie von 86 % ( $\pm 14$ ) an (Abbildung 3.30c).

Die häufigsten sporadisch auftretenden Aberrationstypen in den Nachkommen mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen waren für die Giemsa- und mFISH-Methode Chromosomen- und Chromatidbrüche sowie dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Zusätzlich wurden in maximal 10 % der analysierten Metaphasen pro Kolonie sporadische Translokationen mit der mFISH-Methode festgestellt.

#### **Zusammenfassung zytogenetischer Veränderungen der Nachkommen mit Röntgenstrahlung bestrahlten Fibroblasten in Kolonien**

Die häufigsten detektierten instabilen strukturellen Aberrationen in den Nachkommen der schein- und mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen waren für die Giemsa- und mFISH-Analysen Chromosomen- und Chromatidbrüche sowie dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Mit der mFISH-Methode konnten sporadische Translokationen in maximal 10 % der analysierten Metaphasen pro Kolonie beobachtet werden. Mit steigender Dosis kam es zu einer Zunahme klonaler Aberrationen, die jeweils in allen analysierten Metaphasen einer Kolonie vorhanden waren. Die Anzahl dieser Aberrationen pro Metaphase sowie deren Komplexität stieg ebenfalls mit der Dosis an. Es wurden zusätzlich sporadisch

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

entstandene und klonal expandierende Translokationen beobachtet, die nicht in 100 % der analysierten Metaphasen einer Kolonie vorhanden waren. Auffällig war dabei eine häufige Beteiligung der Chromosomen 2 und 14.

#### **3.2.4 Zytogenetische Veränderungen der Nachkommen gezielt mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten in Kolonien**

Die Bestrahlung von Einzelzellen mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] wurde an der Mikrosonde der GSI durchgeführt. Dabei wurden einzelne Fibroblasten gezielt mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Ionen pro Zellkern bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen vereinzelt und die direkten Nachkommen in Kolonien zytogenetisch mittels der Giesma- und mFISH-Methode untersucht. Für ein Experiment wurde zusätzlich die Proteinexpression zellzyklusrelevanter Proteine in Nachkommen der mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen im Vergleich zu schein-bestrahlten Zellen untersucht. Parallel zu den Kolonien wurden auch Massenkulturen aus bestrahlten Einzelzellen weitergeführt. Es wurden bis zu 1000 mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlte Zellen sowie parallel dazu schein-bestrahlte Zellen zusammengeführt und in Langzeitkulturen bis zur replikativen Seneszenz kultiviert. Es sollten dabei Unterschiede der Entwicklung klonaler Nachkommen in Kolonien und in Massenkulturen bezüglich des Einflusses von Populationsdynamiken und der Selektion von weniger geschädigten Zellen untersucht und mit vorliegenden Ergebnissen von "broadbeam"-Experimenten verglichen werden. Im folgenden Abschnitt werden zuerst der direkten Chromosomenschäden nach einer Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] und anschließend die Entwicklung direkter Nachkommen gezielt mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten Einzelzellen in Kolonien betrachtet. Schein-bestrahlte Zellen dieser Experimente wurden zusammenfassend bereits in Abschnitt 3.2.2 behandelt.

##### **3.2.4.1 Analyse direkter Chromosomenschäden nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion**

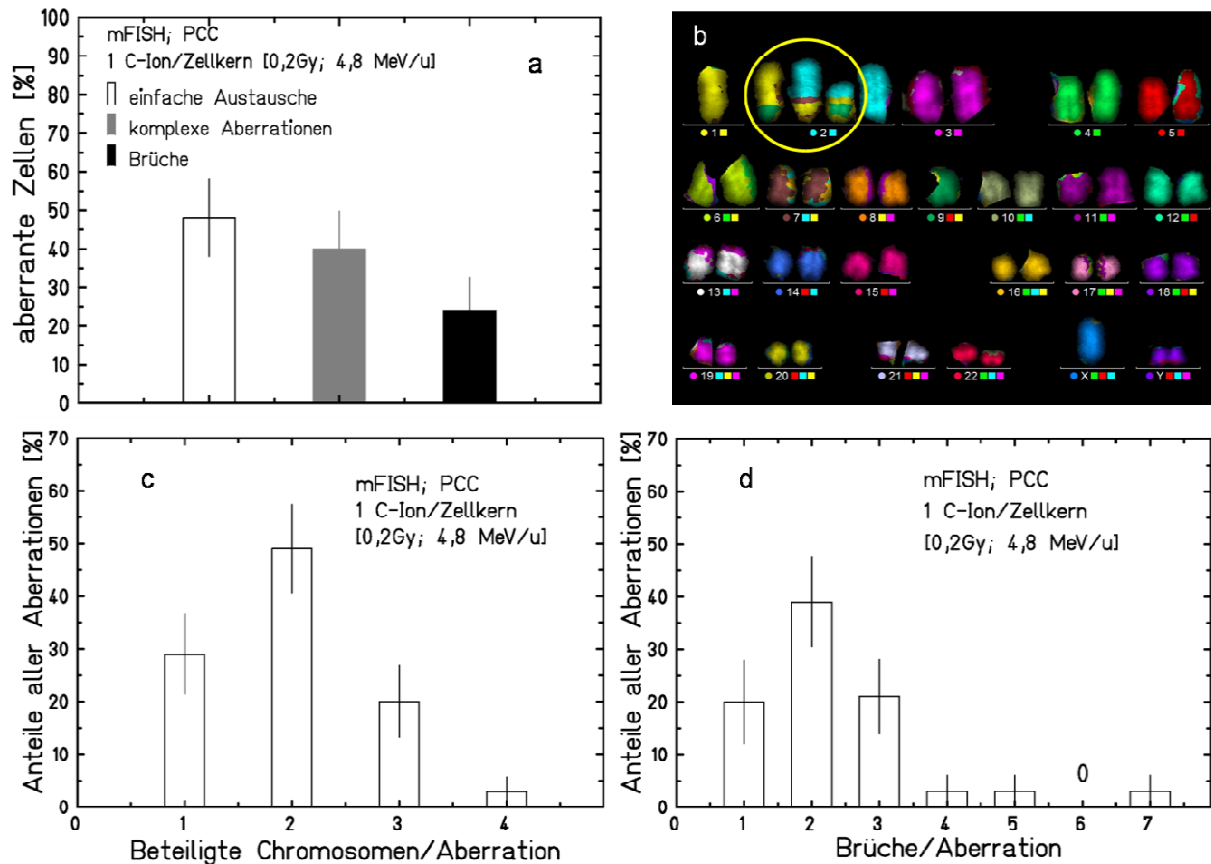
Mittels der „PCC“-Methode kann eine frühzeitige Chromosomenkondensation durch den Phosphataseinhibitor Calyculin-A in der G2-Phase des Zellzyklus herbeigeführt werden (G2-PCCs). Diese Technik ermöglicht die zytogenetische Analyse von Interphasezellen, wodurch im Vergleich zur Analyse von Metaphasen die Auswirkungen eines strahleninduzierten Zellzyklusarrestes auf die Chromosomenanalyse reduziert werden (Gotoh und Durante 2006, Gotoh *et al.* 1999). Da Fibroblasten allerdings überwiegend in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren, kommt dieser Effekt nicht so deutlich zum Tragen wie z.B. bei Lymphozyten, die

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

einen Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus zeigen. Es wurden Chromosomenschäden in schein-bestrahlten Zellen und Zellen, die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern an der Mikrosonde bestrahlt wurden in Mitosen und G2-PCCs mittels der mFISH-Methode untersucht. Fibroblasten zeigen 35-45 h nach der Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [11 MeV/u] in „broadbeam“-Experimenten bis zu einer Dosis von 1 Gy ein Maximum von Zellen in der 1. Mitose (Tenhumberg *et al.* 2007). Entsprechend wurden Analysenzeitpunkte, die in dieser Zeitspanne lagen und eine maximale Anzahl an Mitosen zeigten, ausgewählt. Da diese Chromosomenpräparationen mit nur maximal 3000 Zellen aus 5-6 Bestrahlungsproben pro Zeitpunkt durchgeführt wurden, lagen nur sehr wenige auswertbare Präparate vor.

In schein-bestrahlten Zellen wurden 40 h nach der Bestrahlung 11 % aberrante Zellen beobachtet. In 7 % der Zellen wurden dabei Translokationen festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt lagen 36 % der Chromosomenpräparate der Kontrolle als Metaphasen und 64 % als G2-PCCs vor. Zellen, die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] an der Mikrosonde bestrahlt wurden, zeigten bei einer Analyse von G2-PCCs und Metaphasen 44 h nach der Bestrahlung 67 % aberrante Zellen. Zu diesem Zeitpunkt lagen 20 % der analysierten Chromosomenpräparate als Metaphasen und 80 % als G2-PCCs vor. Wie in Abbildung 3.31a für die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy, 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen dargestellt, gingen 48 % und 40 % aller Aberrationen auf einfache Austausche bzw. komplexe Aberrationen zurück. 24 % der aberranten Zellen zeigten einfache Chromosomenbrüche. Ein mFISH-gefärbter Karyotyp einer frühzeitig kondensierten Zelle in der G2-Phase des Zellzyklus nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] mit einer komplexen Aberration, an der drei Chromosomen mit drei Brüchen beteiligt waren, ist in Abbildung 3.31b dargestellt. Für einfache Austausche (0,34/Zelle) wurde eine leicht höhere Aberrationsrate im Vergleich zu komplexen Aberrationen (0,26/Zelle) beobachtet. Die Komplexität der chromosomalen Aberrationen, gemessen an der Anzahl beteiligter Chromosomen sowie den Brüchen pro Aberration sind in Abbildung 3.31c und d dargestellt. An den chromosomalen Aberrationen waren in den meisten Fällen 2 und maximal 4 Chromosomen beteiligt. Es traten in der Anteilig größten Fraktion von Aberrationen 2 Brüche auf. Bei einer komplexen Aberration wurden maximal 7 Chromosomenbrüche beobachtet.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

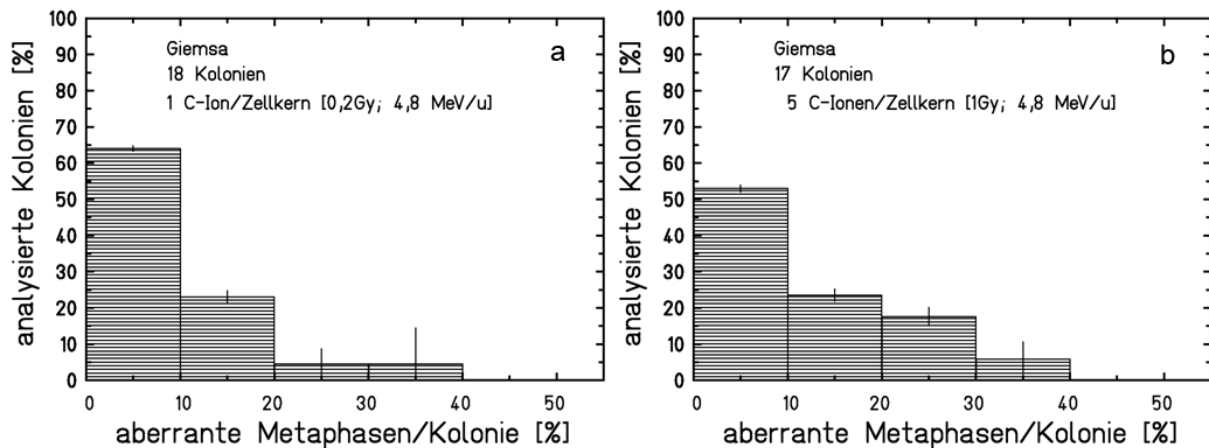


**Abbildung 3.31:** Ergebnisse der mFISH-Analysen chromosomaler Aberrationen in frühzeitig kondensierten Interphasechromosomen (PCCs) und Mitosen nach einer gezielten Bestrahlung der Zellen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern. (a) Anteile aberranter Metaphasen (67 %) mit einfachen Austauschen, komplexen Aberrationen oder Chromosomenbrüchen. Komplexe chromosomale Aberrationen wurden nach der Anzahl der beteiligten Chromosomen, Arme und Brüche (C/A/B) klassifiziert (Cornforth 2001). (b) mFISH-gefärbter Karyotyp einer frühzeitig kondensierten G2-Interphase-Zelle nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] mit einer vollständigen komplexen Aberration (1'-9) (2'-1) (9'-2) (CAB: 3/3/3). (c) Verteilung der Anzahl involvierter Chromosomen und (d) Verteilung der Anzahl der Brüche pro Aberration an allen analysierten Aberrationen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

#### 3.2.4.2 Zytogenetische Veränderungen in Kolonien der Nachkommen mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten

Die Ergebnisse der Giemsa-Analysen der Kolonien von mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen wurden, wie bereits in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, klassifiziert und sind in Abbildung 3.32 dargestellt.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.32:** Ergebnisse der Giemsa-Analysen chromosomaler Aberrationen der Kolonien ursprünglich mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen. (a) 18 Kolonien deren Ursprungszellen mit einem Ion pro Zellkern (0,2 Gy) und (b) 17 Kolonien deren Ursprungszellen mit fünf Ionen pro Zellkern (1 Gy) bestrahlt wurden. Zwecks Übersichtlichkeit wurden die Fraktionen aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

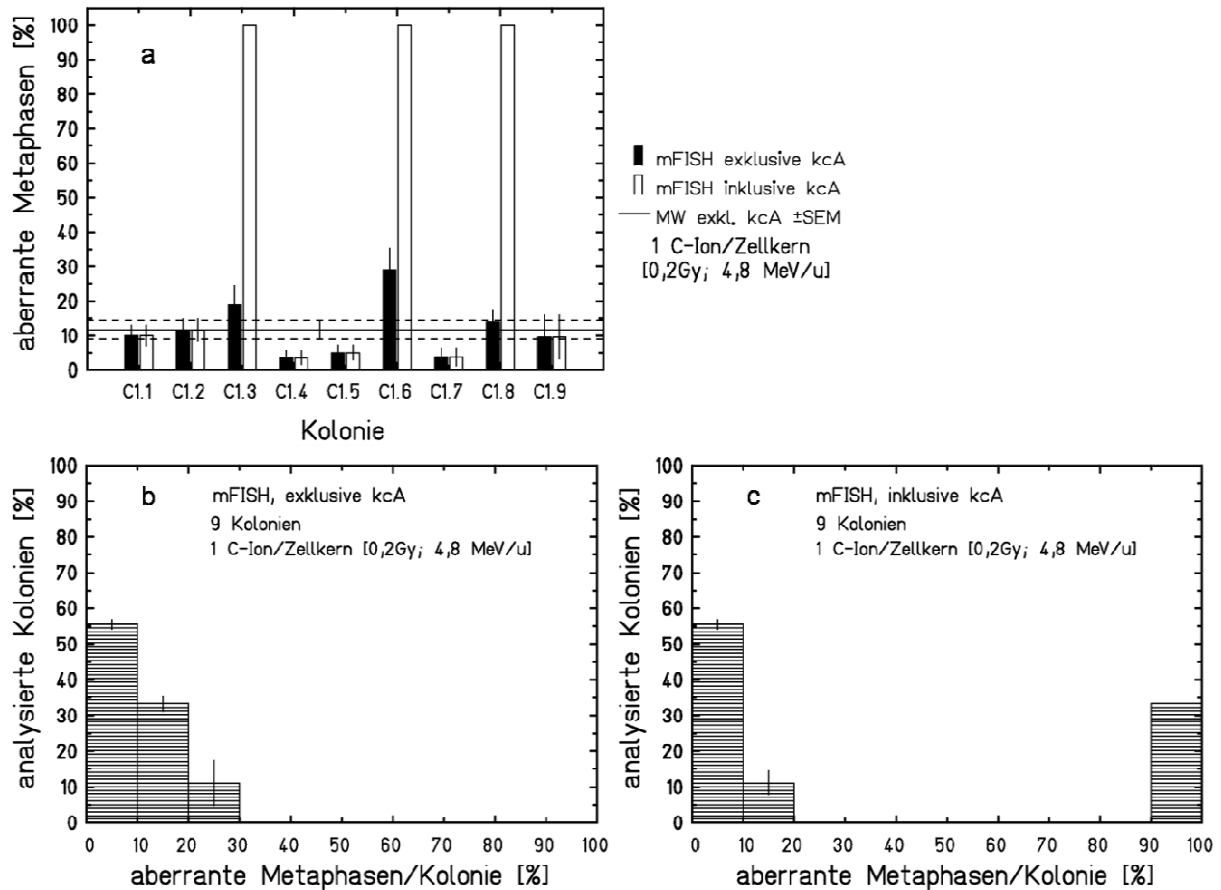
Es wurden insgesamt 18 Kolonien, deren Ursprungszellen mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] pro Zellkern bestrahlt wurden, mit der Giemsa-Methode analysiert (Abbildung 3.32a). Der größte Anteil analysierter Kolonien (64 %) zeigte 0-10 % aberrante Metaphasen pro Kolonie. In 23 % der Kolonien traten 11-20 % aberrante Metaphasen pro Kolonie auf. Es kam in jeweils zwei der Kolonien (11 %) zu höheren Aberrationsraten von 23 % und 35 % aberranten Metaphasen pro Kolonie durch die Bildung von Chromatidbrüchen, bzw. dizentrischen Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Es wurde insgesamt ein mittlerer Anteil von 9,2 % ( $\pm 2,3$ ) aberranten Metaphasen pro Kolonie beobachtet.

In Abbildung 3.32b sind die Ergebnisse der Giemsa-Analysen von 17 Kolonien, deren Ursprungszellen mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern bestrahlt wurden dargestellt. 53 % der analysierten Metaphasen zeigten weniger als 10 % aberrante Metaphasen pro Kolonie. In 2 Kolonien (12 %) wurden höhere Anteile aberranter Metaphasen von 21-30 % beobachtet. Der mittlere Anteil aberranter Metaphasen pro analysierter Kolonie lag bei 13,5 % ( $\pm 2,2$ ). In Kolonien mit höheren Anteilen aberranter Metaphasen traten besonders häufig dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente auf.

Zusammenfassend wurde für Giemsa-Analysen der klonogenen Nachkommen von Einzelzellen, die mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlt wurden, eine nur schwach erhöhte mittlere Fraktion aberranter Metaphasen pro analysierter Kolonie in Zellen nach Bestrahlung mit fünf Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] (13,5 %  $\pm 2,2$ ) gegenüber einem Ionendurchgang (9,2 %  $\pm 2,3$ ) festgestellt. Die in allen Nachkommen der mit einem (0,2 Gy) und fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen am häufigsten auftretenden Aberrationstypen waren Chromosomen und Chromatidbrüche. Vereinzelt wurden in Kolonien mit höheren Aberrationsraten dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente beobachtet.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der mFISH-Analysen der Kolonien der mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten Einzelzellen vorgestellt. mFISH-Analysen von 7 Kolonien, deren Ursprungszellen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden, sind in Abbildung 3.33 dargestellt und, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, zusammengefasst.



**Abbildung 3.33:** Ergebnisse der mFISH-Analysen chromosomaler Aberrationen von 9 Kolonien der Nachkommen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen. Jede klonale chromosomale Aberration (kcA) wurde entweder nur als eine Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“), oder als eigenständige Aberration und damit mehrfach gewertet („inklusive kcA“). (a) Anteile aberranter Metaphasen aller analysierten Kolonien. Der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler, SEM) aberranter Metaphasen für sporadische Aberrationen („exklusive kcA“) aller analysierten Kolonien ist angegeben. (b) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie ohne klonale Aberrationen (exklusive kcA“) und (c) mit klonalen Aberrationen („inklusive kcA“), wobei die Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Wurden nur sporadische Aberrationen der Nachkommen der mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen in Kolonien betrachtet, zeigte der höchste Anteil von 56 % aller analysierten Kolonien ein niedriges Niveau von 0-10 % aberranten Metaphasen pro Kolonie (Abbildung 3.33b). In 33 % der Kolonien wurde ein höherer Anteil von 11-20 % und in 11 % der analysierten Kolonien ein Anteil von 21-30 % aberranten Metaphasen beobachtet. Aus diesen Ergebnissen wurde ein mittlerer Anteil von 12 % ( $\pm$  2,7) aberranten Metaphasen pro Kolonie für sporadische strukturelle Aberrationen aus mFISH-Analysen ermittelt. In einer



### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

Kolonie (C1.6) und damit 11 % aller analysierten Kolonien wurde dieser Mittelwert überschritten (Abbildung 3.33a).

In 3 der insgesamt 9 analysierten Kolonien wurden klonale Aberrationen in 100 % der analysierten Metaphasen der jeweiligen Kolonien festgestellt (Abbildung 3.33a). Alle klonalen Aberrationen in Kolonien der mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

**Tabelle 3.6:** Klonale Aberrationen in Kolonien der Nachkommen von Einzelzellen, die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden. Der prozentuale Anteil der Zellen mit klonalen Aberrationen an der Gesamtzahl der analysierten Metaphasen pro Kolonie ist angegeben. Aberrationen, die in 100 % der analysierten Metaphasen einer Kolonie detektiert wurden, sind rot hervorgehoben.

Kolonie	Klonale Aberrationen [%]				
C1.3	(8'-19) (19'-8) [100%]				
C1.6	(9'-11) (11'T) [14%]	(9'-11) (11'T) (14'-11) [56%]	(9'-11) (11'T) (14'-14) [12%]	(9'-11) (11'T) (14'-13) [8%]	(9'-11) (11'T) (21'-6) [10%]
C1.8	(8'-6-8) (6'T) [91%]	(8'-6-8) (6'T) (10'-16) [9%]			

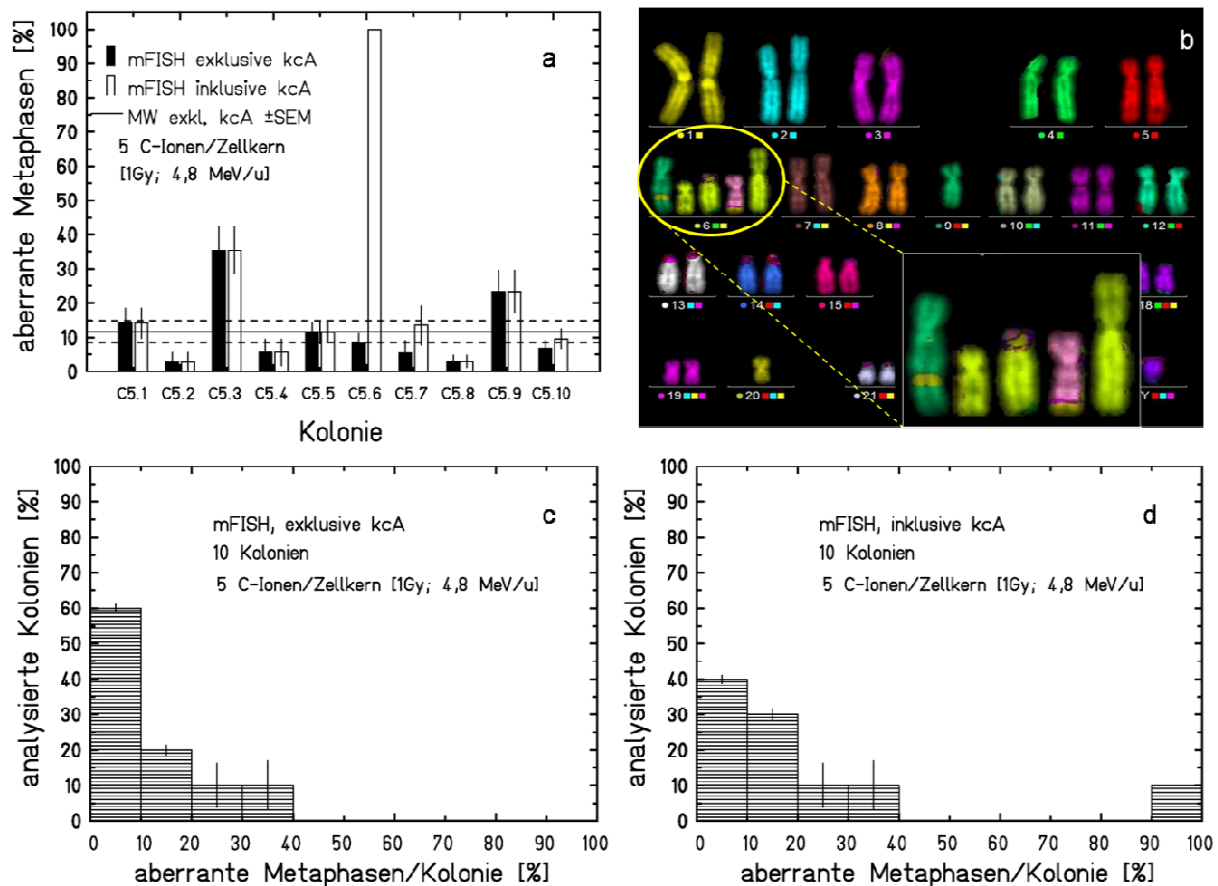
In zwei der Kolonien kam es neben klonalen Aberrationen, die in 100 % der analysierten Metaphasen einer Kolonie auftraten, zu klonalen Aberrationen, die in weniger Metaphasen einer Kolonie detektiert wurden. In einer Kolonie (C1.6) war Chromosom 14 an drei klonalen Translokationen beteiligt und in einer Kolonie (C1.8) trat neben der Insertion (8'-6-8) (6'T), die in allen Metaphasen vorlag, die Translokation (10'-16) in 9 % der Zellen auf.

Wurden bei der mFISH-Auswertung der chromosomalen Aberrationen die Klonalität, als Expansionsrate der Zellen pro Kolonie dieser Aberrationen berücksichtigt und damit jede klonale Aberration ihrem Auftreten nach einzeln gewertet, stieg der mittlere Wert aberranter Metaphasen je analysierter Kolonie von 12 % ( $\pm 2,7$ ) auf 38,5 % ( $\pm 15,5$ ).

Die am häufigsten beobachteten strukturellen Aberrationen waren Chromosomenbrüche, Chromatidbrüche und dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Sporadische Translokationen wurden in jeweils 1-5 % der Zellen pro Kolonie festgestellt.

In Abbildung 3.34 sind die Ergebnisse der mFISH-Analysen von 10 Kolonien der mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen dargestellt. Die Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie wurden in den Abbildungen 3.34b und c, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, zusammengefasst.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.34:** Ergebnisse der mFISH-Analysen chromosomaler Aberrationen von 10 Kolonien der Nachkommen mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen. Jede klonale Aberration wurde entweder nur als eine Aberration, unabhängig von der Expansion und Gesamtzahl („exklusive kcA“) oder als einzelne, eigenständige Aberration mehrfach („inklusive kcA“) gewertet. (a) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie aller analysierten Kolonien. Der Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler, SEM) aberranter Metaphasen für sporadische Aberrationen („exklusive kcA“) aller analysierten Kolonien ist angegeben. (b) mFISH-gefärbte Metaphase der komplexen klonalen Aberration (17'-20) (17-20'-6) (9'-20-9) (6'T), die in 100 % der analysierten Metaphasen der Kolonie C5.6 auftrat. (c) Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie ohne klonale Aberrationen (exklusive kcA“) und (d) mit klonalen Aberrationen („inklusive kcA“), wobei die Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie in Klassen zu Schritten von je 10 %-Punkten gruppiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Bei der Betrachtung rein sporadischer Aberrationen aus mFISH-Analysen in Kolonien der mit 5 Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Einzelzellen, wurden in 60 % aller analysierten Kolonien maximal 10 % aberrante Metaphasen pro Kolonie beobachtet (Abbildung 3.34c). 20 % der Kolonien zeigten zwischen 11-20 % aberrante Metaphasen pro Kolonie und jeweils 10 % zwischen 21-30 %, bzw. 30-40 % aberrante Metaphasen pro Kolonie. Es wurde ein mittlerer Anteil von 12 % ( $\pm$  3,3) aberranten Metaphasen pro analysierter Kolonie bestimmt. In 20 % aller analysierten Kolonien wurde dieser mittlere Wert aberranter Metaphasen mit sporadischen Aberrationen pro Kolonie überschritten (Abbildung 3.34a).

In den Kolonien der mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen wurde nur in einer Kolonie eine klonale Aberration in 100 % der analysierten Metaphasen festgestellt (Abbildung 3.34a). Diese bestand aus einer komplexen transmissiblen Aberration und ist

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

anhand eines mFISH-gefärbten Karyotyps in Abbildung 3.34b dargestellt. Alle klonalen Aberrationen sind Tabelle 3.7 aufgeführt.

**Tabelle 3.7:** Klonale Aberrationen in Kolonien der Nachkommen von Einzelzellen, die mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden. Der prozentuale Anteil der Zellen mit klonalen Aberrationen an der Gesamtzahl der analysierten Metaphasen pro Kolonie ist angegeben. Aberrationen, die in 100 % der analysierten Metaphasen einer Kolonie detektiert wurden, sind rot hervorgehoben.

Kolonie	Klonale Aberrationen [%]
C5.6	(17'-20) (17-20'-6) (9'-20-9) (6'T) [100%]
C5.7	(14'p-17) [11%]
C5.10	(2'-21') [5%]

In zwei weiteren Kolonien wurde die klonale Expansion von sporadischen Translokationen auf 5 % und 11 % der Metaphasen festgestellt. An diesen Translokationen waren, wie bereits zuvor in Kolonien der Nachkommen schein- und mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen beobachtet, die Chromosomen 2 und 14 beteiligt.

Wurden, wie in Abbildung 3.34d gezeigt, die klonalen Aberrationen in die mFISH-Auswertung einbezogen, kam es zu einer annähernden Verdopplung des mittleren Wertes der aberranten Metaphasen pro Kolonie für sporadische Aberrationen von 12 % ( $\pm 3,3$ ) auf 22 % ( $\pm 9$ ), hauptsächlich hervorgerufen durch eine klonale Aberration, die in 100 % der analysierten Metaphasen der Kolonie C5.6 auftrat.

In den Nachkommen der mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen handelte es sich bei den hauptsächlich beobachteten Aberrationstypen um Chromosomenbrüche, Chromatidbrüche, dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente sowie einfache Translokationen.

#### **Zusammenfassung der zytogenetischen Veränderungen der gezielt mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten in Kolonien**

Die Anteile von Zellen mit sporadischen chromosomalen Aberrationen aus Giemsa- und mFISH-Analysen in Kolonien der gezielt mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Einzelzellen waren im Vergleich zu den Nachkommen von Zellen, die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden, nur sehr schwach erhöht. Die am häufigsten auftretenden Aberrationstypen waren Chromosomen- und Chromatidbrüche sowie dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente. Mit der mFISH-Methode konnten sporadische einfache Translokationen in bis zu maximal 9 % der analysierten Metaphasen

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

pro Kolonie festgestellt werden. In den Nachkommen der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen wurden in 33 % der Kolonien in jeweils 100 % der analysierten Metaphasen pro Kolonie klonale Aberrationen festgestellt. Dies war nach einer Bestrahlung mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] nur in 10 % der Kolonien der Fall. Klonal expandierende Aberrationen, die nicht in 100 % der analysierten Metaphasen einer Kolonien vorhanden waren, traten nach Bestrahlung mit einem (0,2 Gy) und fünf (11 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] auf, allerdings deutlich reduziert im Vergleich zu schein-bestrahlten und mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen.

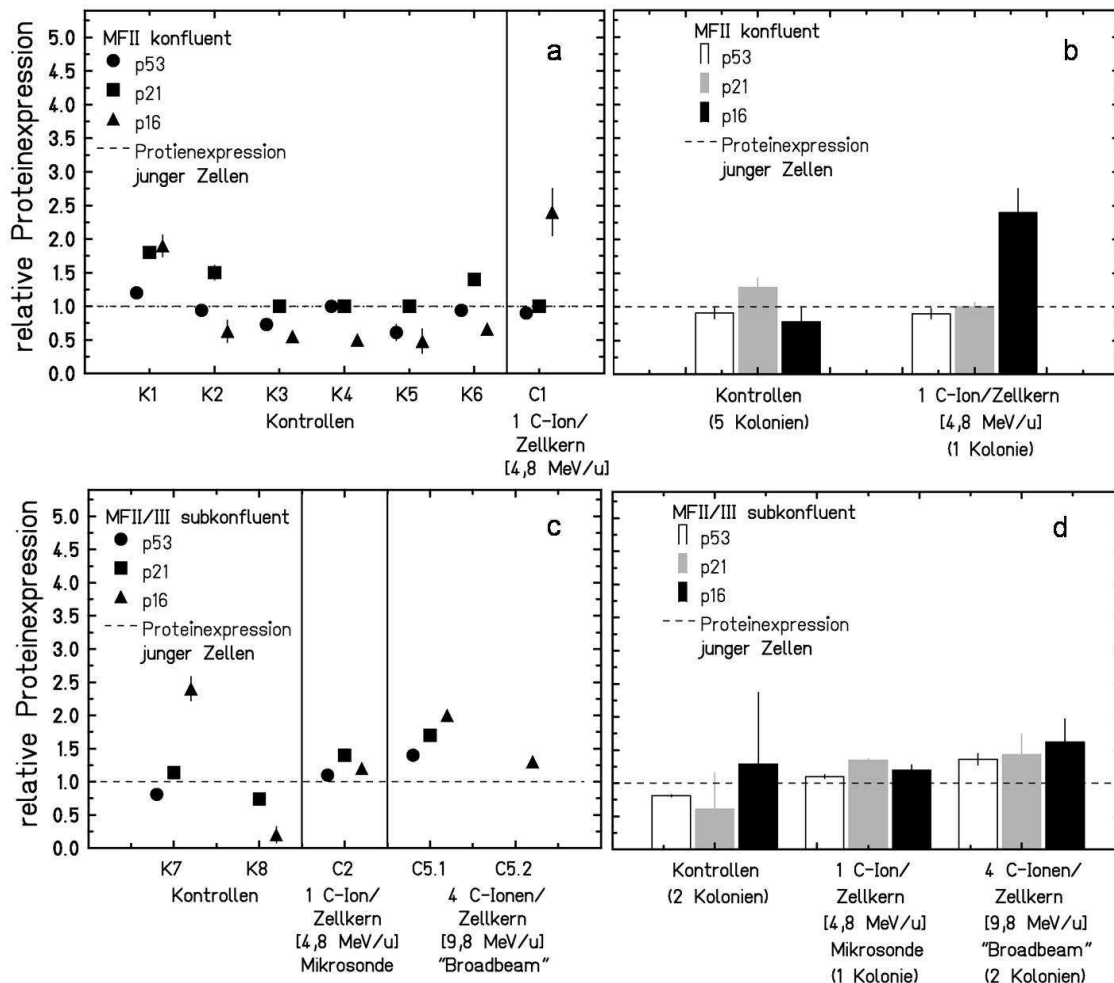
#### **3.2.5 Entwicklung der Proteinexpression in klonogenen Nachkommen von Fibroblasten nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen**

Die Expression der zellzyklusregulierenden Proteine p53, p21, p16, die in Fibroblasten im Zusammenhang mit der zellulären Seneszenz stehen, wurde in Kolonien schein-bestrahlter AG1522D-Zellen sowie den Nachkommen von Einzelzellen, die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden, mittels der In-Cell-Western-Methode untersucht. Als Vergleich wurden Kolonien aus einem „broadbeam“-Experiment herangezogen, in dem konfluente Massenkulturen von AG1522D-Zellen mit im Mittel 4 Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u; 0,5 Gy;  $2 \times 10^6$  Teilchen/cm<sup>2</sup>] pro Zelle bestrahlt wurden.

Da eine Veränderung der Zellmorphologie ein Charakteristikum des relativen zellulären Alters und der replikativen Seneszenz von Fibroblasten darstellt und mit veränderter Proteinexpression einhergeht (Bayreuther *et al.* 1988, Rodemann 1989), wurden die morphologischen Differenzierungsstadien der Kolonien zum Analysenzeitpunkt als ein Indikator des Zellalters herangezogen. Ferner wurde die erreichte Zelldichte berücksichtigt, da diese methodisch bedingt einen Einfluss auf das Ergebnis hatte. Für die hier verwendete Methode des sogenannten „In Cell Western“ sollte unter normalen Messbedingungen ein konfluenter Zellrasen erreicht werden. Bis zu einer Konfluenz von mindestens 60-70 %, im Folgenden nur noch als konfluent bezeichnet, wurden verwertbare Ergebnisse erzielt und nach den morphologischen Differenzierungsstadien und der Zelldichte klassifiziert: 1.) konfluente mitotisch aktive Fibroblasten (MFII/III), 2.) subkonfluente mitotisch aktive Fibroblasten, 3.) konfluente postmitotische Fibroblasten (PMFs) und 4.) subkonfluente postmitotische Fibroblasten. Alle Ergebnisse der Proteinexpression wurden in Relation zu nicht bestrahlten und konfluenten jungen AG1522D-Zellen gesetzt.

Die Ergebnisse für Kolonien konfluenter sowie subkonfluenter mitotisch aktiver Fibroblasten (MFII/III) sind in Abbildung 3.34a und b dargestellt.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.35:** Ergebnisse des In-Cell-Western der relativen zellulären Mengen der zellzyklusregulierenden Proteine p53, p21 und p16 in mitotisch aktiven Kolonien schein-bestrahlter sowie mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u, 9,8 MeV/u] bestrahlten Fibroblasten im Verhältnis zu nicht-bestrahlten, konfluente jungen Zellen. Die Kolonien wurden nach morphologischem Differenzierungsstadium und Konfluenz der Zellen zum Analysenzeitpunkt klassifiziert. (a) Relative Proteinexpression konfluenter mitotisch aktiver Fibroblasten (MFII) in 6 schein-bestrahlten Kolonien sowie einer Kolonie aus Nachkommen einer mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zelle. (b) Mittlere Expressionsniveaus der Kolonien aus (a). (c) Relative Expressionsniveaus subkonfluenter, mitotisch aktiver Fibroblasten (MFII/III) in 2 schein-bestrahlten Kolonien sowie einer Kolonie aus Nachkommen einer mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zelle und 2 Kolonien aus Zellen, die in Massenkulturen mit im Mittel 4 Kohlenstoff-Ionen [0,5 Gy; 9,8 MeV/u] in einem „broadbeam“-Experiment bestrahlt wurden. (d) Mittlere Expressionsniveaus der Kolonien aus (c). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die relative zelluläre Proteinexpression wurde für konfluente, mitotisch aktive Fibroblasten (MFII) in 6 Kolonien schein-bestrahlter Zellen (K1-6) und einer Kolonie aus Nachkommen einer mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] bestrahlten Zelle (C1) untersucht (Abbildung 3.35a). Mittlere Expressionsniveaus dieser Kolonien sind in der Abbildung 3.34b dargestellt. Die relativen Expressionsniveaus von p53, p21 und p16 der schein-bestrahlten Zellen entsprachen meist denen junger konfluenter Zellen. In einer Kolonie (K1) wurden 2-fach erhöhte zelluläre Mengen von p21 und p16 und in einer weiteren Kolonie (K2) ein leicht erhöhtes Niveau von p21 festgestellt. In den Nachkommen der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8

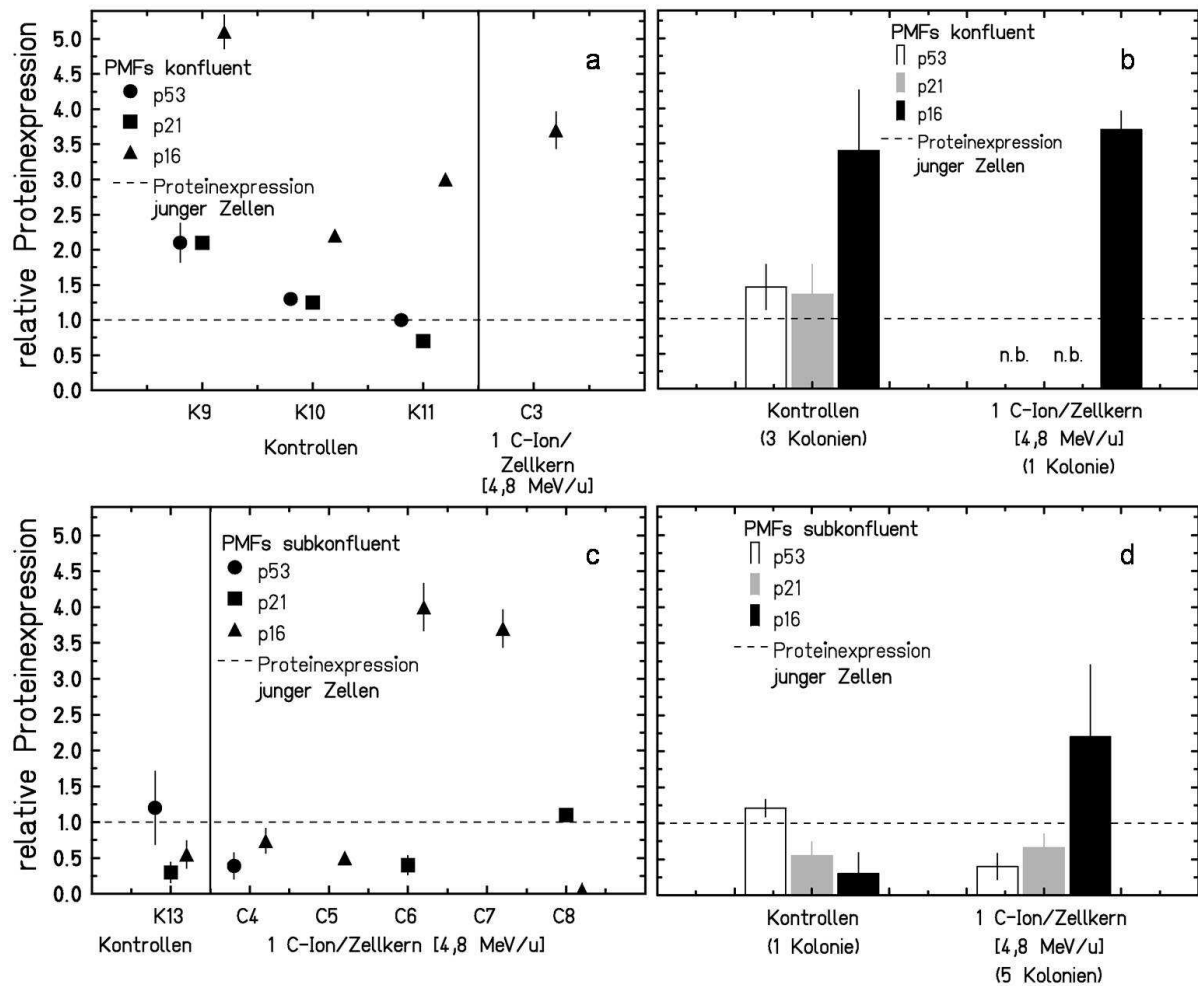
### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

MeV/u] bestrahlten Zelle (C1) wurde ein 2,5-fach erhöhtes Expressionsniveau von p16 beobachtet.

Die Ergebnisse der relativen Proteinexpression subkonfluenten mitotischer (MFII/III) Kolonien sind in Abbildung 3.35c und d dargestellt. In zwei untersuchten Kolonien (K7 und 8) scheinbestrahlter Zellen wurde in einer Kolonie (K7) eine 2,5-fach erhöhte zelluläre Menge von p16 festgestellt. Für dieses Differenzierungsstadium und Zelldichte wurden ebenfalls die Nachkommen von 2 Zellen, die bei einem „broadbeam“-Experiment in Massenkulturen im Mittel mit 4 Kohlenstoff-Ionen [0,5 Gy; 9,8 MeV/u] bestrahlt wurden, untersucht. In einer der Kolonien (C5.1) ließen sich leicht erhöhte zelluläre Mengen von p53 und p21 und ein 2-fach erhöhtes Niveau von p16 feststellen. Für die zweite Kolonie (C5.2) lag nur eine Analyse für p16 vor, bei der eine ähnliche Proteinexpression im Vergleich zu konfluenten jungen Zellen festgestellt wurde.

Die relative Proteinexpression in Kolonien scheinbestrahlter und bestrahlter Zellen in postmitotischen Differenzierungsstadien (PMFs) ist in Abbildung 3.36 dargestellt.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.36:** Ergebnisse des In-Cell-Western der relativen zellulären Mengen der zellzyklusregulierenden Proteine p53, p21 und p16 in postmitotischen Kolonien schein-bestrahlter sowie mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Fibroblasten im Verhältnis zu nicht-bestrahlten, konfluenten jungen Zellen. Die Kolonien wurden nach morphologischem Differenzierungsstadien und Konfluenz der Zellen zum Analysenzeitpunkt klassifiziert. (a) Relative Proteinexpression konfluenten postmitotischer Fibroblasten (PMFs) in 3 schein-bestrahlten Kolonien sowie einer Kolonie aus Nachkommen einer mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zelle. (b) Mittlere Expressionsniveaus der Kolonien aus (a) (n.b. = nicht bestimmt). (c) Relative Expressionsniveaus subkonfluenten, postmitotischer Fibroblasten (PMFs) in einer schein-bestrahlten Kolonie sowie fünf Kolonien aus Nachkommen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen. (d) Mittlere Expressionsniveaus der Kolonien aus (c). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die Ergebnisse der relativen Expression von p53, p21 und p16 für 3 konfluente postmitotische Kolonien (PMFs) schein-bestrahlter Zellen (K9, 10 und 11) sind in Abbildung 3.36a dargestellt. In allen Kolonien wurden im Vergleich zu jungen Zellen deutlich erhöhte zelluläre Mengen von p16 festgestellt, die in einer Kolonie (K9) bis zu 5-fach erhöht waren. In dieser Kolonie (K9) wurden ebenfalls 2-fach erhöhte zelluläre Mengen von p53 und p21 beobachtet. In einer Kolonie, deren Ursprungszelle mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurde (C3), war das zelluläre p16-Niveau ebenfalls deutlich (3,7-fach) erhöht. p53 und p21 konnten in dieser Kolonie aufgrund zu niedriger Zellzahlen nicht untersucht werden.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

Die relativen Expressionsniveaus von p53, p21 und p16 postmitotischer, subkonfluenter Kolonien konnten nur in einer Kolonie schein-bestrahlter Zellen (K13) bestimmt werden (Abbildung 3.36c und d). Es wurden im Vergleich zu jungen Zellen keine erhöhten zellulären Mengen der untersuchten Zellzyklusinhibitoren festgestellt. Diese lagen für p16 und p21 noch unter dem Niveau konfluenter junger Zellen. Für dasselbe Differenzierungsstadium und Zelldichte wurden 5 Nachkommen von Einzelzellen, die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden, untersucht. In zwei dieser Kolonien (C6 und 7) wurde eine stark erhöhte zelluläre Menge an p16 beobachtet (3,5- und 4-fach). Die Expressionsniveaus von p53 und p21 lagen in allen Kolonien leicht unter dem konfluenter junger Zellen.

Zusammenfassend wurden für die relative Proteinexpression von p53, p21 und p16 für schein-bestrahlte und mitotisch aktive Kolonien nur geringe Unterschiede zu konfluenten jungen Zellen festgestellt. In den Nachkommen einer mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zelle wurde ein höheres Expressionsniveau von p16 beobachtet. In post-mitotischen Kolonien kam es in Nachkommen schein-bestrahlter, wie auch bestrahlter Einzelzellen, hauptsächlich zu stark erhöhten zellulären Mengen von p16.

#### **3.2.6 Langzeitentwicklung von Fibroblasten nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion in Massenkulturen**

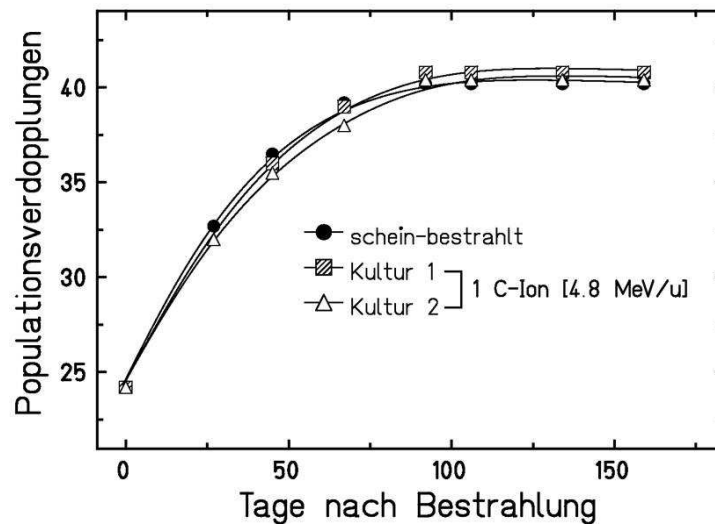
Die Langzeitentwicklung gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlter Fibroblasten, wurde neben Kolonien, ebenfalls in Massenkulturen untersucht. Es wurden dabei zwei Massenkulturen nach gezielter Bestrahlung von Einzelzellen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] aus jeweils 800 bis 1000 Zellen aus zwei Bestrahlungsproben untersucht. Parallel dazu wurde eine Kultur schein-bestrahlter Zellen mitgeführt.



### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

#### 3.2.6.1 Proliferation mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten Fibroblasten in Massenkulturen

In Abbildung 3.37 ist die Proliferation schein-bestrahlter sowie gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlter Zellen anhand der Entwicklung von PDs über einen Zeitraum von 160 Tagen dargestellt.



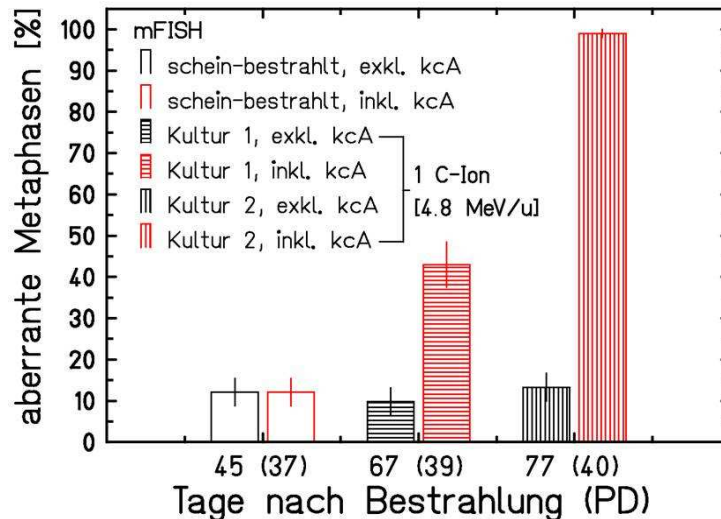
**Abbildung 3.37:** Zeitliche Entwicklung der PDs schein-bestrahlter sowie gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen in Massenkulturen über einen Zeitraum von 160 Tagen. Die Kulturen wurden mit jeweils 800-1000 Einzelzellen gestartet. Eine erste Passage der Zellen wurde 27 Tage nach der Bestrahlung und im Anschluss 14-tägig durchgeführt. Für alle Kulturen wurde eine proliferationsaktive Phase bis 92 Tage nach der Bestrahlung beobachtet und es wurden in allen Fällen maximal 40 PDs erreicht.

Bezüglich der Länge der teilungsaktiven Phase und der maximal durchlaufenen PDs beim Erreichen der replikativen Seneszenz war kein Unterschied zwischen den Populationen der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] oder schein-bestrahlten Zellen feststellbar. Die replikative Seneszenz wurde in allen Populationen 92 Tage nach der Bestrahlung mit einer maximalen Anzahl von 40 PDs erreicht.

#### 3.2.6.2 Zytogenetische Veränderungen mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten Fibroblasten in Massenkulturen

mFISH-Analysen der Zellen in Massenkulturen wurden zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Anteile aberranter Metaphasen der jeweiligen Populationen in Abbildung 3.38 dargestellt.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 3.38:** Anteile aberranter Metaphasen in Massenkulturen aus mFISH-Analysen schein-bestrahlten sowie aus mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Einzelzellen (Kultur 1 und 2) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung. Klonale Aberrationen wurden nicht („exkl. kcA“) oder in die Auswertung einbezogen („inkl. kcA“). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Für schein-bestrahlte Zellen wurde 47 Tage nach Bestrahlung ein maximaler Anteil von 12 % aberranten Metaphasen beobachtet. Für zwei Massenkulturen, deren Zellen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden, lagen Analysen zu späteren Zeitpunkten der Kultivierung 67 und 77 Tage nach Bestrahlung vor. Beide Kulturen zeigten für rein sporadische chromosomale Aberrationen („exklusive kcA“) mit schein-bestrahlten Zellen eines etwas früheren Zeitpunktes nach Bestrahlung vergleichbare Anteile aberranter Metaphasen von 10 % und 13 %. Die in allen Populationen sporadisch auftretenden Aberrationstypen waren Translokationen sowie Chromosomen- und Chromatidbrüche.

Wurden klonale Aberrationen in die Auswertung einbezogen („inklusive kcA“), kam es in den Nachkommen der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen zu einem deutlichen Anstieg der Anteile von Zellen mit aberranten Metaphasen. In der Population schein-bestrahlter Zellen wurden keine klonalen Aberrationen detektiert. In Tabelle 3.8 sind, neben klonalen Aberrationen und deren Expansionsraten in den jeweiligen Populationen, alle detektierten transmissiblen Aberrationen der Massenkulturen schein-bestrahlter und bestrahlter Zellen zusammengefasst.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

**Tabelle 3.8:** Transmissible Aberrationen aus mFISH-Analysen der Nachkommen schein-bestrahlter oder mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG5122D-Zellen in Massenkulturen, die zu unterschiedlichen Analysenzeitpunkten detektiert wurden. Für klonal expandierende Aberrationen sind die Expansionsraten der Zellen als prozentuale Anteile an der jeweiligen Gesamtpopulation angegeben.

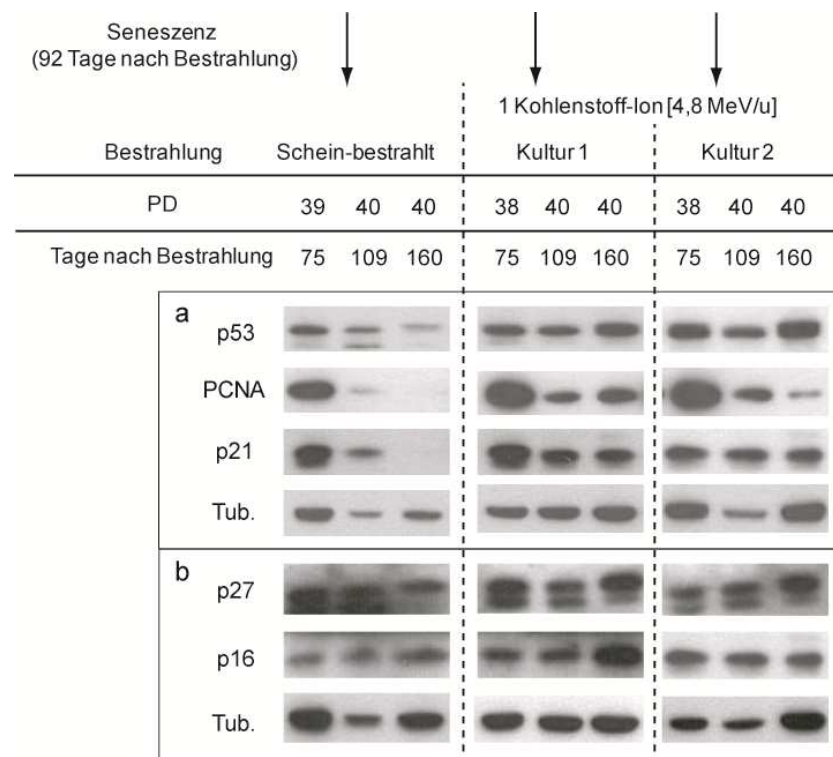
	Schein-bestrahlt	1 Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u]	
		Kultur 1	Kultur 2
Tage nach Bestrahlung (PD)	49 (37)	67 (39)	77 (40)
Transmissible Aberrationen	(14'-1)	(14'-18) (del 18'T) [34 %]	(11'-13) (13'T) (14'-11) [89 %]
	(14'-17)	(5'-8) (8'-5) [2 %]	(11'-13) (13'T) (14'-11) (14'-18) [2 %]
	(14'-6)	(14'-14)	(11'-13) (13'T) (14'-11) (14'-2) [3 %]
	(2'-2)	(2'-17) (17'T)	(11'-13) (13'T) (14'-11) (14'-14)
			(11'-13) (13'T) (14'-11) (14'-9)
			(14'-16)
			(9'-13) (13'-9)

In einer Kultur der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen (Kultur 1) kam es bei Berücksichtigung aller klonalen Aberrationen zu einer Steigerung des Anteils aberranter Metaphasen von 10 % auf 43 %. In 34 % der Zellen trat eine einfache unvollständige Translokation (14'-18) (del18'T) auf und in 2 % der Zellen eine andere, einfache vollständige Translokation (5'-8) (8'-5). In der anderen Massenkultur der Nachkommen der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen (Kultur 2) wurde in 96 % der Zellen die klonale komplexe Aberration (11'-13) (13'T) (14'-11) beobachtet. Zusätzlich zu dieser klonalen Aberration traten die zwei unvollständigen Translokationen (14'-2) und (14'-18) als Subklone in wenigen Zellen (2-3 %) auf. Auffallend war, dass Chromosom 14 sehr häufig und bereits in der Kontrollpopulation an der Bildung transmissibler Aberrationen beteiligt war, die aber nur in den Nachkommen der bestrahlten Zellen in Massenkulturen klonal expandierten.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

#### 3.2.6.3 Langzeitentwicklung der Proteinexpression mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten Fibroblasten in Massenkulturen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der zeitlichen Entwicklung der zellulären Mengen der zellzyklusregulierenden Proteine p53, p21, p27 und p16 in schein-bestrahlten sowie mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Einzelzellen (2 Populationen), vorgestellt. Des Weiteren wurde die Expression von PCNA, einem Proliferationsmarker, über den Kultivierungsverlauf verfolgt. Da die Massenkulturen mit jeweils 800 bis 1000 Einzelzellen gestartet wurden, lagen erst zu mittleren bis späten Zeitpunkten der Kultivierung (75 Tage nach Bestrahlung) ausreichende Zellzahlen für Proteinanalysen mittels der Western-Blot-Methode vor. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich alle Populationen bereits in zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz, die in allen Populationen 92 Tage nach Bestrahlung mit 40 PDs erreicht wurde. Repräsentative Western-Blots sind in Abbildung 3.39 dargestellt.



**Abbildung 3.39:** Repräsentative Western-Blots der zeitlichen Entwicklung zellulärer Proteinmengen in Massenkulturen schein-bestrahlter sowie in zwei Populationen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Fibroblasten. Es wurden (a) p53, PCNA und p21 sowie (b) p27 und p16 detektiert. Tubulin wurde zur Kontrolle der geladenen Proteinmenge detektiert. (n = 2; n = Anzahl der Aufträge).

In der Kontrollpopulation wurde 109 Tage nach Bestrahlung und damit kurz nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz eine leicht erhöhte zelluläre Menge von p53 wie auch p16 festgestellt. Die Expressionsniveaus von PCNA und p21 gingen zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung deutlich zurück und waren 160 Tage nach Bestrahlung nicht mehr detektierbar.

### 3. Ergebnisse – Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

Das Expressionsniveau von p27 blieb über die Kultivierungsdauer konstant. In einer Kultur aus mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen (Kultur 1) blieb die zelluläre p53-Menge zu den untersuchten Zeitpunkten nach Bestrahlung unverändert. Die Expressionssniveaus von PCNA und p21 gingen ab 109 Tagen nach Bestrahlung deutlich zurück. Für p27 und p16 wurde hingegen 160 Tage nach Bestrahlung ein Anstieg der zellulären Mengen beobachtet. In einer zweiten Massenkultur aus mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen (Kultur 2) wurde kurz nach dem Erreichen der Seneszenz (109 Tage nach Bestrahlung) ein deutlicher Anstieg der zellulären Mengen von p53 und p21 sowie etwas schwächer für p27 und p16 beobachtet, gefolgt von einem Rückgang 160 Tage nach Bestrahlung. Das Expressionsniveau von PCNA ging 109 Tage nach Bestrahlung deutlich zurück.

Zusammenfassend wurden damit in beiden bestrahlten Populationen (Kultur 1 und 2) mit Erreichen der replikativen Seneszenz, teilweise höhere zelluläre Mengen der Zellzyklusinhibitoren p53, p21, p16 und sowie p27 beobachtet. Die Expression des Replikations-Kofaktors PCNA ging in allen Populationen mit verminderter Proliferation deutlich zurück.

#### **Zusammenfassung der Langzeitentwicklung mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten Fibroblasten in Massenkulturen**

Zusammenfassend wurde damit in den Nachkommen der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Einzelzellen in Massenkulturen, die zu späten Zeitpunkten der Kultivierung mindestens zu 40 % auf die Expansion einer Einzelzelle mit einer klonalen transmissiblen Aberration zurückgingen, keine oder nur leichte Unterschiede im Vergleich zu scheinbestrahlten Zellen festgestellt. Es zeigte sich eine vergleichbare Proliferationsaktivität mit demselben Zeitpunkt der replikativen Seneszenz sowie ähnliche Anteile sporadischer chromosomaler Aberrationen in diesen Zellen und eine vergleichbare Expression zellzyklusregulierender Proteine.

### 3.3 ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

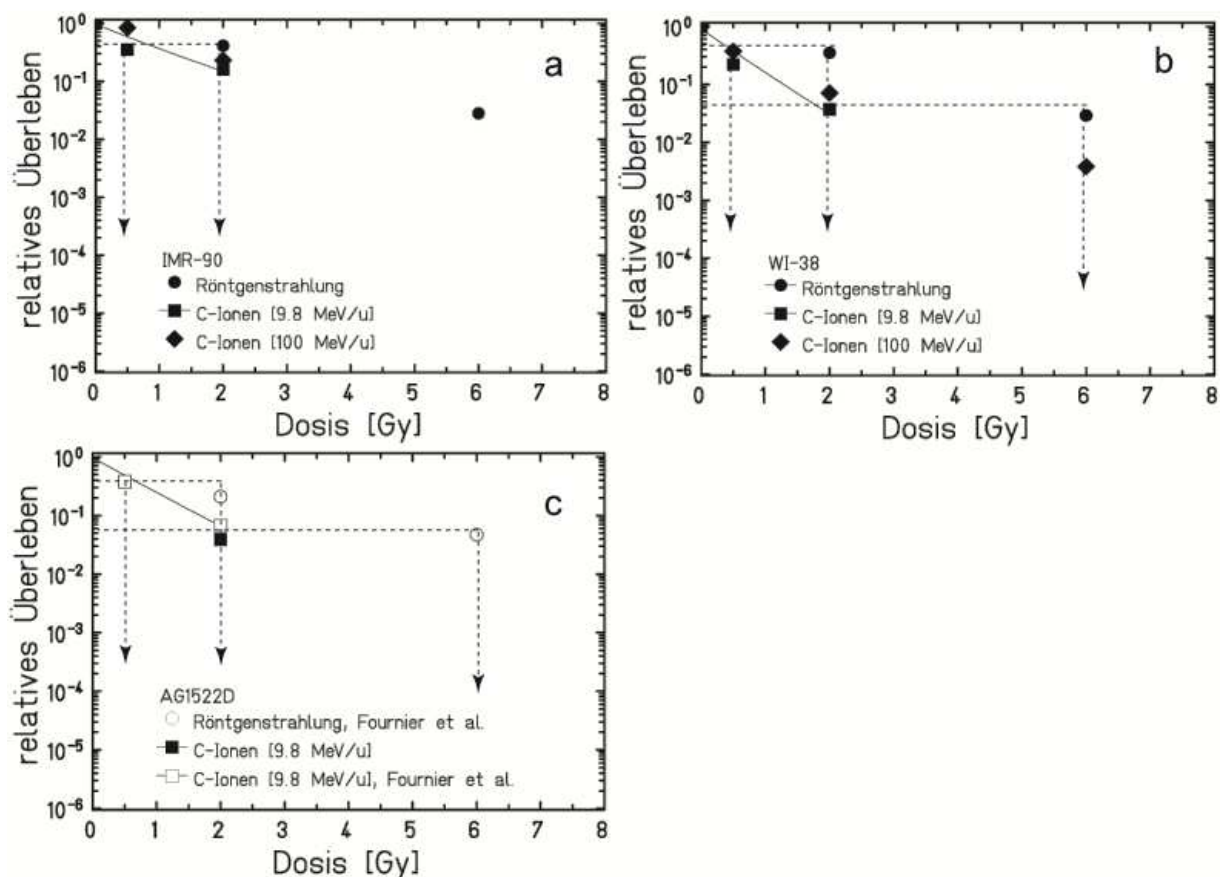
Die intrazelluläre ROS-Akkumulation nach Einwirkung dünn- oder dichtenionisierender Strahlung wurde in drei humanen Fibroblastenlinien (IMR-90, WI-38, AG1522D) aus verschiedenen Ursprungsgeweben (Lunge, Vorhaut) untersucht. Oxidativer Stress und damit einhergehend die intrazelluläre Akkumulation von ROS wird im Zusammenhang mit einer strahleninduzierten frühzeitigen Seneszenz (Fournier *et al.* 2007, Zahnreich *et al.* 2010), programmiertem Zelltod (Orrenius *et al.* 2007) und genomischer Instabilität in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen diskutiert (Clutton *et al.* 1996, Tominaga *et al.* 2004). Zusätzlich wurden gewebespezifische sowie spenderabhängige Unterschiede zwischen zwei verwendeten Lungenfibroblastenlinien (IMR-90 und WI-38) bezüglich der zellulären ROS-Akkumulation nach Bestrahlung untersucht.

Die Analysen wurden für eine frühe Strahlenantwort in den ersten Tagen nach Bestrahlung in Abständen von drei Tagen bis maximal 9 Tage nach Bestrahlung asynchroner Kulturen mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u, 100 MeV/u] mittels durchflusszytometrischer Messung der Oxidation der ROS-spezifischen Fluorochrome DCFH-DA und DHE durchgeführt. DCFH-DA wird intrazellulär durch ein breites Spektrum an ROS (u.a. Hydroxyl-, Peroxyl-, Nitrat-, Carbonatradikale) zu fluoreszierendem DCF oxidiert. DHE wird hauptsächlich zum Nachweis primärer Radikale wie dem Superoxid Anion herangezogen, deren Quelle meist die mitochondriale Elektronentransportkette darstellt. Die Intensität der DHE-Fluoreszenz wird durch Oxidation und DNA-Interkalation um ein 50-100-faches gesteigert. Durch Messung der Fluoreszenzintensitäten beider Fluorochrome wurde ein möglichst breites Spektrum an ROS abgedeckt (Übersicht in (Wardman 2007, Halliwell und Whiteman 2004) ).

Die Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation wurde in den Nachkommen bestrahlter Zellen kurz vor sowie nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz untersucht. Zur Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation nach Bestrahlung wurde jeweils ein Experiment mit AG1522D-, WI-38- und NHDF-Zellen für eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlung durchgeführt. Für niederenergetische Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] lag nur ein Experiment mit AG1522D-Zellen vor, die bis zur replikativen Seneszenz kultiviert wurden, und daher für ROS-Messungen zur Verfügung standen.

### 3.3.1 Relatives Zellüberleben nach Bestrahlung

Für die Messungen einer strahlungsabhängigen ROS-Akkumulation wurden zu Beginn der Experimente isoeffektive Dosen der verschiedenen Strahlenqualitäten ermittelt, d.h. Dosen, die annähernd das gleiche relative Zellüberleben zur Folge hatten. Für AG1522D-Zellen lagen bereits Daten mehrerer Experimente von Fournier *et al.* (Fournier *et al.* 2001) vor, während diese für IMR-90 und WI-38-Zellen in jeweils einem Experiment neu ermittelt wurden. Das relative klonogene Zellüberleben der in diesen Experimenten verwendeten Fibroblastenlinien ist in Abbildung 3.40 dargestellt.



**Abbildung 3.40:** Relatives klonogenes Zellüberleben von (a) IMR-90-, (b) WI-38- und (c) AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, niederenergetischen [9,8 MeV/u] oder hochenergetischen [100 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen. Die Ergebnisse der AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] in (c) stammen von Fournier *et al.* (Fournier *et al.* 2001). Isoeffektive Dosen der verschiedenen Strahlenqualitäten, die in einem annähernd gleichen Zellüberleben resultierten, sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Das relative Zellüberleben von IMR-90-Zellen war nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung in Abhängigkeit der Dosis reduziert. Für eine Bestrahlung dieser Zellen mit einer Dosis von 2 Gy wurden allerdings nur relativ geringe Unterschiede zwischen den Strahlenqualitäten bezüglich des relativen Zellüberlebens festgestellt. Das im Vergleich zu einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung höhere Überleben nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u;

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

100 MeV/u] ist wahrscheinlich auf eine fehlerhafte experimentelle Durchführung zurückzuführen. Das relative Zellüberleben von AG1522D- und WI-38-Zellen war nach einer Bestrahlung mit nieder- sowie hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u, 100 MeV/u] deutlich gegenüber einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung reduziert. Zwischen hoch- und niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u, 100 MeV/u] wurden in WI-83-Zellen nur schwache Unterschiede beobachtet.

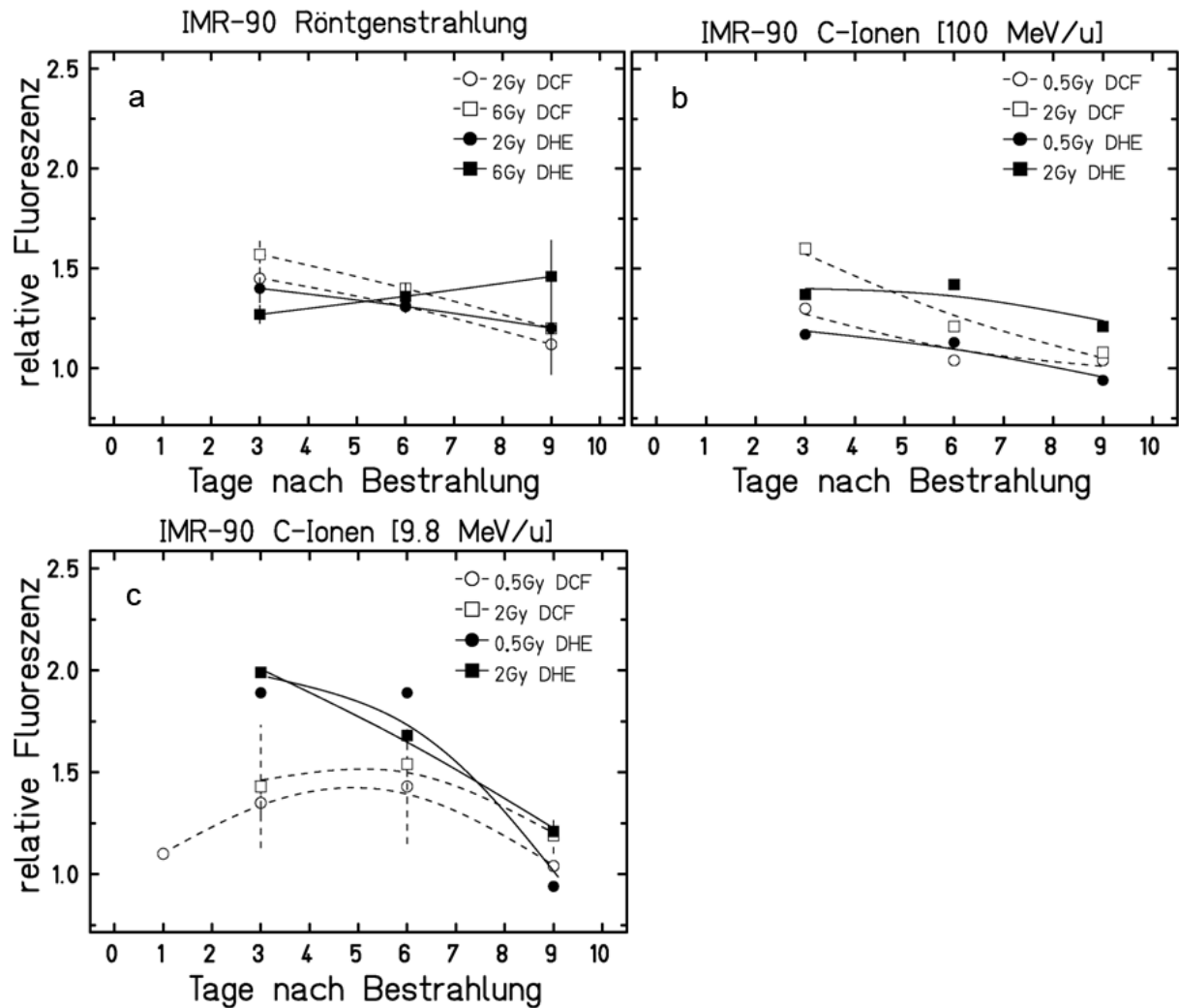
Die ermittelten isoeffektiven Dosen bezüglich des klonogenen Zellüberlebens lagen damit für WI-38- und AG1522D-Zellen bei einer Bestrahlung mit nieder- sowie hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u, 100 MeV/u] mit Dosen von 0,5 Gy und 2 Gy im Vergleich zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung bei entsprechend höheren Dosen von 2 und 6 Gy. Diese Dosen wurden für die folgenden Bestrahlungsexperimente aller Fibroblastenlinien gewählt.

##### **3.3.2 Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in IMR-90-Zellen nach Bestrahlung**

Die Ergebnisse der ROS-Akkumulation in IMR-90-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder nieder- bzw. hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u, 100 MeV/u] sind als relative Fluoreszenzintensitäten der ROS-spezifischen Fluorochrome DCF und DHE in Abbildung 3.41 dargestellt. Die Messungen wurden ab 3 Tagen bis 9 Tage nach Bestrahlung in Abständen von 3 Tagen durchgeführt. Für 1 Tag nach Bestrahlung wurde nur in einem Experiment nach Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] eine Messung der DCF-Fluoreszenz durchgeführt.



#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung



**Abbildung 3.41:** Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in IMR-90-Zellen gemessen als relative DCF- oder DHE-Fluoreszenz nach Bestrahlung mit (a) Röntgenstrahlung, (b) hochenergetischen [100 MeV/u] und (c) niederenergetischen [9,8 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen. Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zu schein-bestrahlten IMR-90-Zellen wurde in Abständen von drei Tagen bis maximal 9 Tage nach der Bestrahlung durchgeführt. (Röntgenstrahlung:  $N = 2/n = 1$ ; Kohlenstoff-Ionen: [100 MeV/u]  $N = 1/n = 1$ , [9,8 MeV/u]  $N = 3/n = 1$ ). ( $N$  = Anzahl Experimente,  $n$  = Anzahl Proben).

Nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurden in IMR-90-Zellen die höchsten Fluoreszenzintensitäten von DCF und DHE 3 Tage nach Bestrahlung beobachtet, gefolgt von einem sukzessiven Rückgang auf das Niveau schein-bestrahlter Zellen (Abbildung 3.41a). Es zeigte sich nur eine schwache Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von der Höhe der applizierten Dosis. Für die DHE-Fluoreszenz wurde nach einer Bestrahlung mit 6 Gy Röntgenstrahlung ein Anstieg über die Kultivierungsdauer bis zu einer 1,5-fachen Fluoreszenzintensität der Kontrolle 9 Tage nach Bestrahlung festgestellt.

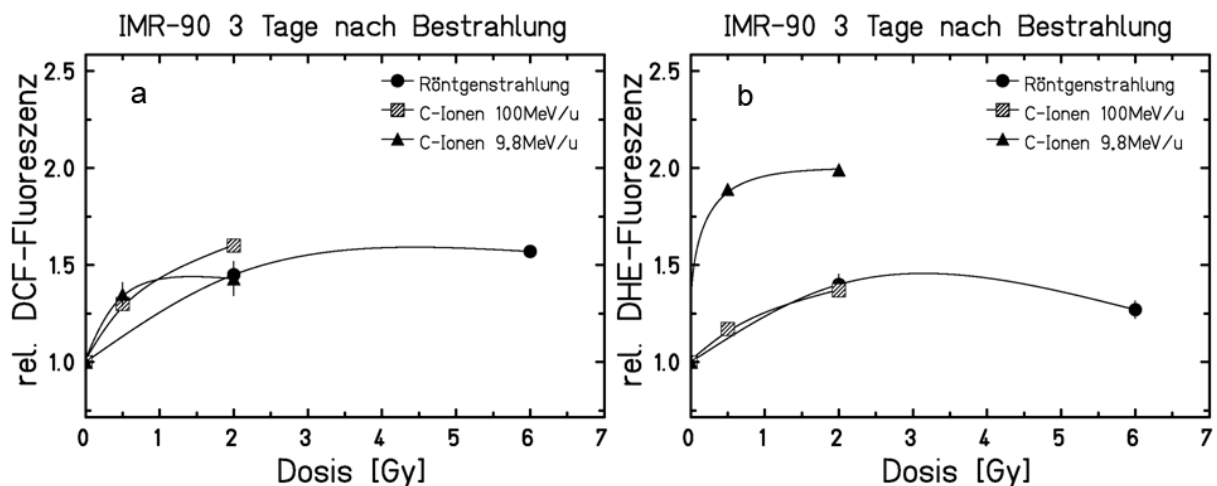
Für die Bestrahlung von IMR-90-Zellen mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] wurden ebenfalls die höchsten DHE- und DCF-Fluoreszenzintensitäten 3 Tage nach der Bestrahlung beobachtet (Abbildung 3.41b). Es wurde ein Anstieg in Abhängigkeit der

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

Höhe der applizierten Dosis festgestellt. Das Niveau der Kontrollpopulation wurde spätestens 9 Tage nach Bestrahlung für alle Dosen wieder erreicht.

Nach einer Bestrahlung von IMR-90-Zellen mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] wurde für beide Fluorochrome die stärkste und von der Höhe der Dosis unabhängige Fluoreszenzintensität von DCF und DHE 3 Tage nach Bestrahlung beobachtet (Abbildung 3.41c). Die DHE-Fluoreszenz war im Vergleich zur DCF-Fluoreszenz deutlich erhöht und ging über die Kultivierungsdauer für beide Dosen kontinuierlich zurück. Eine Messung der DCF-Fluoreszenz lag für ein Experiment bereits einen Tag nach Bestrahlung vor. Es zeigte sich ein Anstieg der Intensität bis 3 Tage nach Bestrahlung. Das erreichte Fluoreszenzniveau blieb bis 6 Tage nach Bestrahlung konstant, gefolgt von einer Reduktion der Fluoreszenz bis 9 Tage nach Bestrahlung.

Die höchsten Fluoreszenzintensitäten wurden damit in IMR-90-Zellen für alle Strahlenqualitäten 3 Tage nach Bestrahlung beobachtet. Diese sind für die Fluorochrome DCF und DHE in Abbildung 3.42a und b zusammengefasst.



**Abbildung 3.42:** Abhängigkeit der relativen (a) DCF- oder (b) DHE-Fluoreszenz von der Strahlenqualität und Höhe der Dosis in IMR-90-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen ROS-Akkumulation 3 Tage nach Bestrahlung im Verhältnis zur Kontrolle.

Ein Anstieg der DCF-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Höhe der Dosis zeigte sich nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u; 100 MeV/u] etwas deutlicher als im Vergleich zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Bei allen Strahlenqualitäten kam es zu einer Sättigung der Fluoreszenzintensität bei höheren Dosen. Für alle Strahlenqualitäten wurde eine annähernd gleiche und maximal 1,5-fach erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu scheinbestrahlten Zellen erreicht.

Die höchste DHE-Fluoreszenz in IMR-90-Zellen wurde ebenfalls 3 Tage nach Bestrahlung beobachtet (Abbildung 3.42b). Die stärkste und im Vergleich zu scheinbestrahlten Zellen 2-fach erhöhte Fluoreszenzintensität wurde nach Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] und bereits für die niedrigere Dosis von 0,5 Gy festgestellt. Nach

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

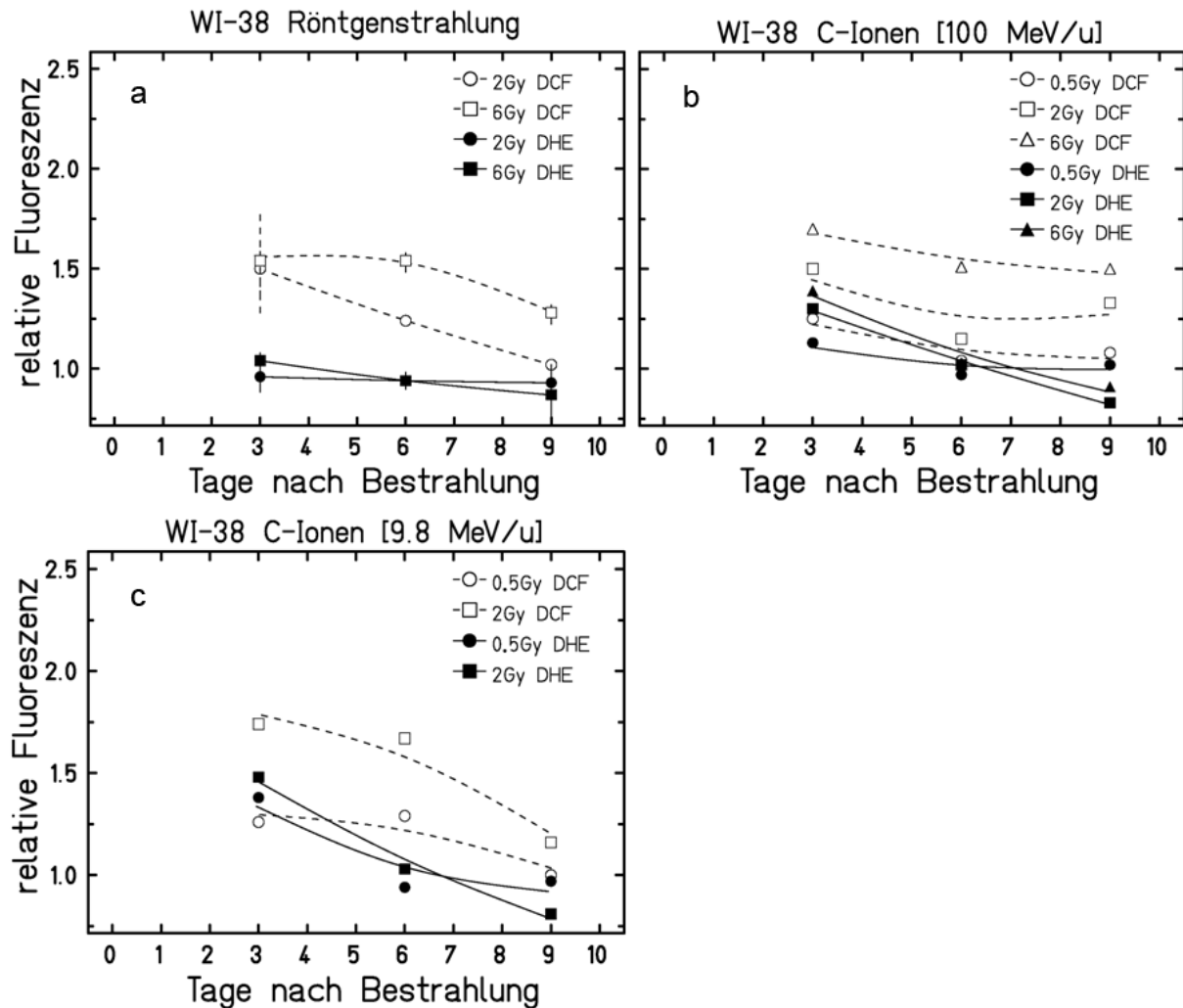
Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] und Röntgenstrahlung wurden vergleichbare DHE-Fluoreszenzintensitäten bis zu einer Dosis von 2 Gy festgestellt. Für eine höhere Röntgendosis von 6 Gy wurde kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet.

##### **3.3.3 Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in WI-38-Zellen nach Bestrahlung**

Die strahleninduzierte Akkumulation von ROS wurde ebenfalls in WI-38-Zellen und damit neben IMR-90-Zellen in einer weiteren fötalen Lungenfibroblastenlinie untersucht. Es sollte dabei festgestellt werden, ob die bereits in IMR-90-Zellen beobachteten ROS-Akkumulationen (siehe Abschnitt 3.3.2) abhängig von der jeweiligen Fibroblastenlinie und damit vom Spender waren, oder charakteristisch für Lungenfibroblasten und damit das Ursprungsgewebe.

Die zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in WI-38-Zellen, gemessen als DCF- und DHE-Fluoreszenz, ist für die verwendeten Strahlenqualitäten in Abbildung 3.43 dargestellt. Nach Bestrahlung von WI-38-Zellen mit Röntgenstrahlung wurde für beide Dosen die höchste DCF-Fluoreszenzintensität 3 Tage nach Bestrahlung beobachtet. Diese ging für die Dosis von 0,5 Gy über eine Kultivierungsdauer von 9 Tagen sukzessive auf das Kontrollniveau zurück (Abbildung 3.43a). Für die höhere Dosis blieb diese bis 6 Tage nach Bestrahlung konstant, gefolgt von einem schwachen Rückgang. Es wurde keine Änderung der DHE-Fluoreszenz nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung im Vergleich zu schein-bestrahlten Zellen beobachtet.

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung



**Abbildung 3.43:** Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in WI-38-Zellen gemessen als relative DCF- oder DHE-Fluoreszenz nach Bestrahlung mit (a) Röntgenstrahlung, (b) hochenergetischen [100 MeV/u] und (c) niederenergetischen [9,8 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen. Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zu schein-bestrahlten WI-38-Zellen wurde in Abständen von drei Tagen bis maximal 9 Tage nach Bestrahlung durchgeführt. (Röntgenstrahlung:  $N = 2/n = 1$ ; Kohlenstoff-Ionen: [100 MeV/u]  $N = 1/n = 1$ , [9,8 MeV/u]  $N = 1/n = 1$ ). ( $N$  = Anzahl Experimente,  $n$  = Anzahl Proben).

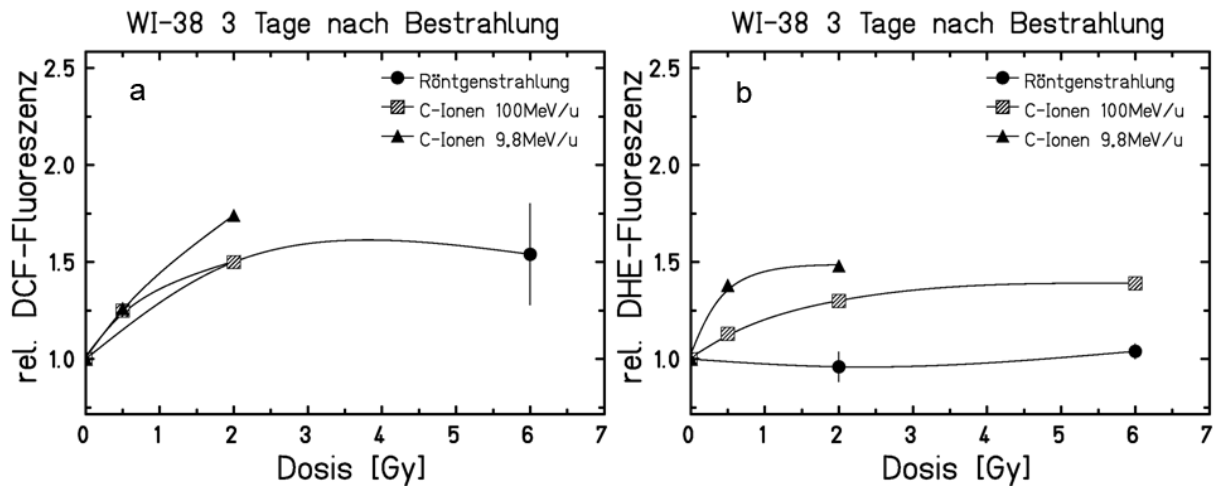
Nach Bestrahlung von WI-38-Zellen mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] mit Dosen von bis zu 6 Gy, wurden für beide Fluorochrome die höchsten Fluoreszenzintensitäten 3 Tage nach Bestrahlung erreicht (Abbildung 3.43b). Für die DCF-Fluoreszenz zeigte sich eine starke Abhängigkeit von der Höhe der Dosis, und die erreichten Intensitäten blieben über eine Kultivierungsdauer von 9 Tagen nach Bestrahlung konstant. Die DHE-Fluoreszenz stieg für eine Bestrahlung mit Dosen von 2 Gy und 6 Gy nur 1,4-fach an und erreichte bereits 6 Tage nach Bestrahlung wieder das Kontrollniveau. Für die niedrigere Dosis von 0,5 Gy wurde keine Änderung der DHE-Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet.

3 Tage nach Bestrahlung von WI-38-Zellen mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] wurden maximale DCF-Fluoreszenzintensitäten, die stark in Abhängigkeit der Dosis

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

anstiegen, beobachtet (Abbildung 3.43c). Diese blieben bis 6 Tage nach Bestrahlung konstant, gefolgt von einer Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die DHE-Fluoreszenz war für diese Strahlenqualität, unabhängig von der Dosis, 3 Tage nach Bestrahlung am höchsten. Das Kontrollniveau wurde für beide Dosen 6 Tage nach Bestrahlung wieder erreicht.

In Abbildung 3.44 sind die beobachteten maximalen Fluoreszenzintensitäten beider Fluorochrome für alle Strahlenqualitäten 3 Tage nach Bestrahlung von WI-38-Zellen zusammengefasst.



**Abbildung 3.44:** Abhängigkeit der relativen (a) DCF- oder (b) DHE-Fluoreszenz von der Strahlenqualität und Höhe der Dosis in WI-38-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen ROS-Akkumulation 3 Tage nach Bestrahlung im Verhältnis zu Kontrollen.

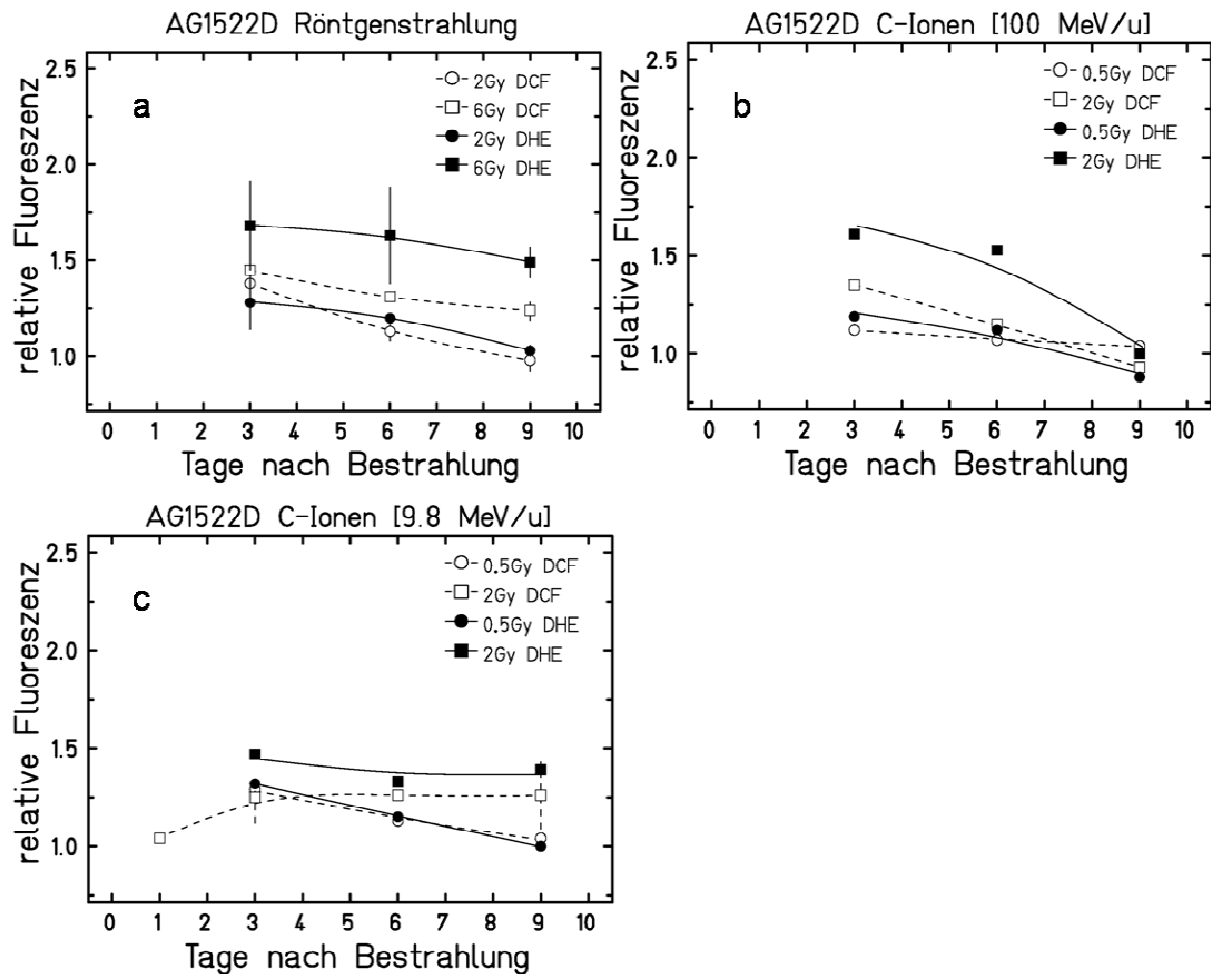
Für eine Bestrahlung von WI-38-Zellen mit Röntgenstrahlung wurde die höchste DCF-Fluoreszenz bereits nach Bestrahlung mit der niedrigeren Dosis von 2 Gy festgestellt (Abbildung 3.44a). Für eine Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen beider Energien [9,8 MeV/u, 100 MeV/u] wurde ein Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Dosis festgestellt. Nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurde keine Intensitätsänderung der DHE-Fluoreszenz beobachtet, während die stärkste DHE-Fluoreszenz 3 Tage nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen bereits für die niedrigeren Dosen von 0,5 Gy festgestellt wurde (Abbildung 3.44b). Diese war für eine Bestrahlung mit niederenergetischen [9,8 MeV/u] gegenüber hochenergetischen [100 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen erhöht.

#### 3.3.4 Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in AG1522D-Zellen nach Bestrahlung

Zusätzlich zu den in Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3 behandelten Lungenfibroblastenlinien (IMR-90, WI-38) wurde eine Vorhautfibroblastenlinie (AG1522D-Zellen) bezüglich einer strahleninduzierten ROS-Akkumulation untersucht, um eventuelle gewebespezifische Unterschiede in der ROS-Akkumulation zu überprüfen. In Abbildung 3.45 sind die relativen Fluoreszenzinten-

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

sitäten von DCF und DHE in AG1522D-Zellen für alle Strahlenqualitäten dargestellt.



**Abbildung 3.45:** Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in AG1522D-Zellen gemessen als relative DCF- oder DHE-Fluoreszenz nach Bestrahlung mit (a) Röntgenstrahlung, (b) hochenergetischen [100 MeV/u] und (c) niederenergetischen [9,8 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen. Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten im Verhältnis zu schein-bestrahlten AG1522D-Zellen wurde in Abständen von drei Tagen bis maximal 9 Tage nach Bestrahlung durchgeführt. (Röntgenstrahlung:  $N = 2/n = 1$ ; Kohlenstoff-Ionen: [100 MeV/u]  $N = 1/n = 1$ , [9,8 MeV/u]  $N = 2/n = 1$ ). ( $N$  = Anzahl Experimente,  $n$  = Anzahl Proben).

Nach Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit Röntgenstrahlung wurde 3 Tage nach Bestrahlung die höchste DHE-Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 3.45a). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität war abhängig von der Höhe der Dosis und blieb bis 6 Tage nach Bestrahlung konstant, gefolgt von einem Rückgang bis 9 Tage nach Bestrahlung. Der deutlichste Anstieg der DCF-Fluoreszenz, ebenfalls 3 Tage nach Bestrahlung, zeigte eine nur schwach ausgeprägte Abhängigkeit von der Höhe der Dosis. Für die niedrigere Dosis von 2 Gy wurde die Fluoreszenzintensität von Kontrollzellen 6 Tage nach Bestrahlung wieder erreicht. Nach einer Bestrahlung mit einer höheren Dosis von 6 Gy ging die relativ erhöhte DCF-Fluoreszenz bis 9 Tage nach Bestrahlung nur leicht zurück.

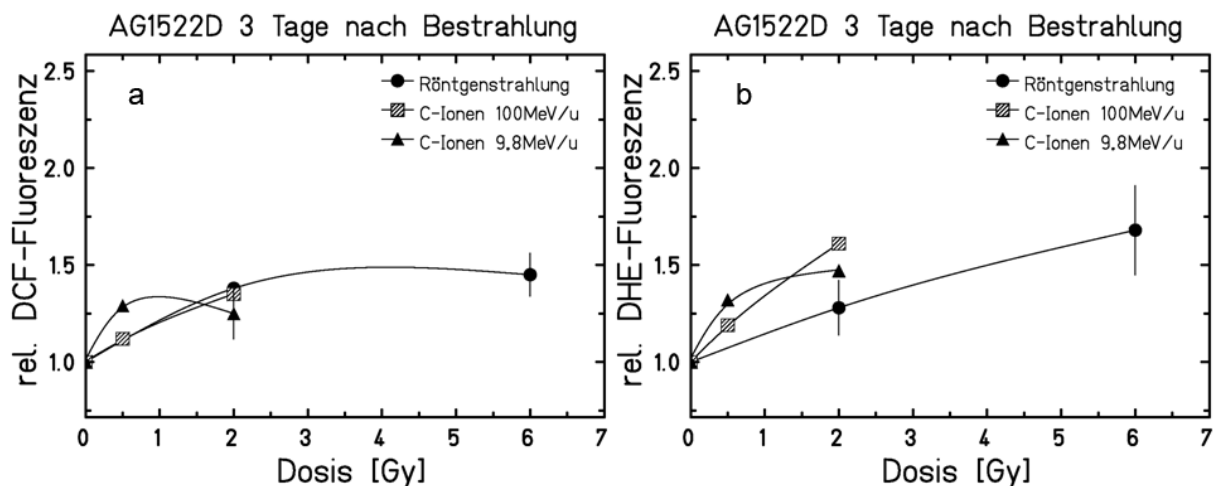
Die Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] führte ebenfalls zu den höchsten DCF- und DHE-Fluoreszenzintensitäten 3 Tage nach Be-

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

strahlung (Abbildung 3.45b). Die DCF-Fluoreszenz ging für die Dosis von 2 Gy über die Kultivierungsdauer von 9 Tagen auf das Kontrollniveau zurück. Für eine niedrigere Dosis von 0,5 Gy war die DCF-Fluoreszenz nur schwach erhöht und blieb über 9 Tage konstant. Die DHE-Fluoreszenz war nach der Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] deutlich in Abhängigkeit der Dosis erhöht und ging über die Kultivierungsdauer von 9 Tagen nach Bestrahlung auf das Kontrollniveau zurück.

Die beobachteten Fluoreszenzintensitäten beider Fluorochrome nach einer Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] erreichten die höchsten Werte 3 Tage nach Bestrahlung (Abbildung 3.45c). Für einen frühen Analysenzeitpunkt der DCF-Fluoreszenz einen Tag nach Bestrahlung zeigte sich ein Anstieg der Intensität bis 3 Tage nach Bestrahlung. Die Fluoreszenzintensitäten für DCF und DHE blieben nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy über den Zeitraum von 9 Tagen unverändert. Für eine niedrigere Dosis von 0,5 Gy zeigten die Intensitäten beider Fluorochrome einen Rückgang auf das Kontrollniveau bis 9 Tage nach Bestrahlung.

In Abbildung 3.46 sind die maximalen Fluoreszenzintensitäten von DCF und DHE in AG1522D-Zellen für alle Strahlenqualitäten 3 Tage nach Bestrahlung zusammengefasst.



**Abbildung 3.46:** Abhängigkeit der relativen (a) DCF- oder (b) DHE-Fluoreszenz von der Strahlenqualität und Höhe der Dosis in AG1522D-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen ROS-Akkumulation 3 Tage nach Bestrahlung im Verhältnis zu Kontrollen.

Zwischen der DCF-Fluoreszenz nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] wurde kein Unterschied festgestellt und es zeigte sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nur bis zu einer Dosis von jeweils 2 Gy (Abbildung 3.46a). Nach einer Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] wurde die höchste DCF-Fluoreszenz bereits nach Bestrahlung mit einer niedrigen Dosis von 0,5 Gy beobachtet.

#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

Wie in Abbildung 3.46b dargestellt, wurde in AG1522D-Zellen nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] ein Anstieg der DHE-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Dosis beobachtet. Für eine Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] wurde für eine höhere Dosis von 2 Gy nur noch ein schwacher Anstieg festgestellt. Für Kohlenstoff-Ionen beider Energien [9,8 MeV/u, 100 MeV/u] wurden vergleichbare Fluoreszenzintensitäten beobachtet.

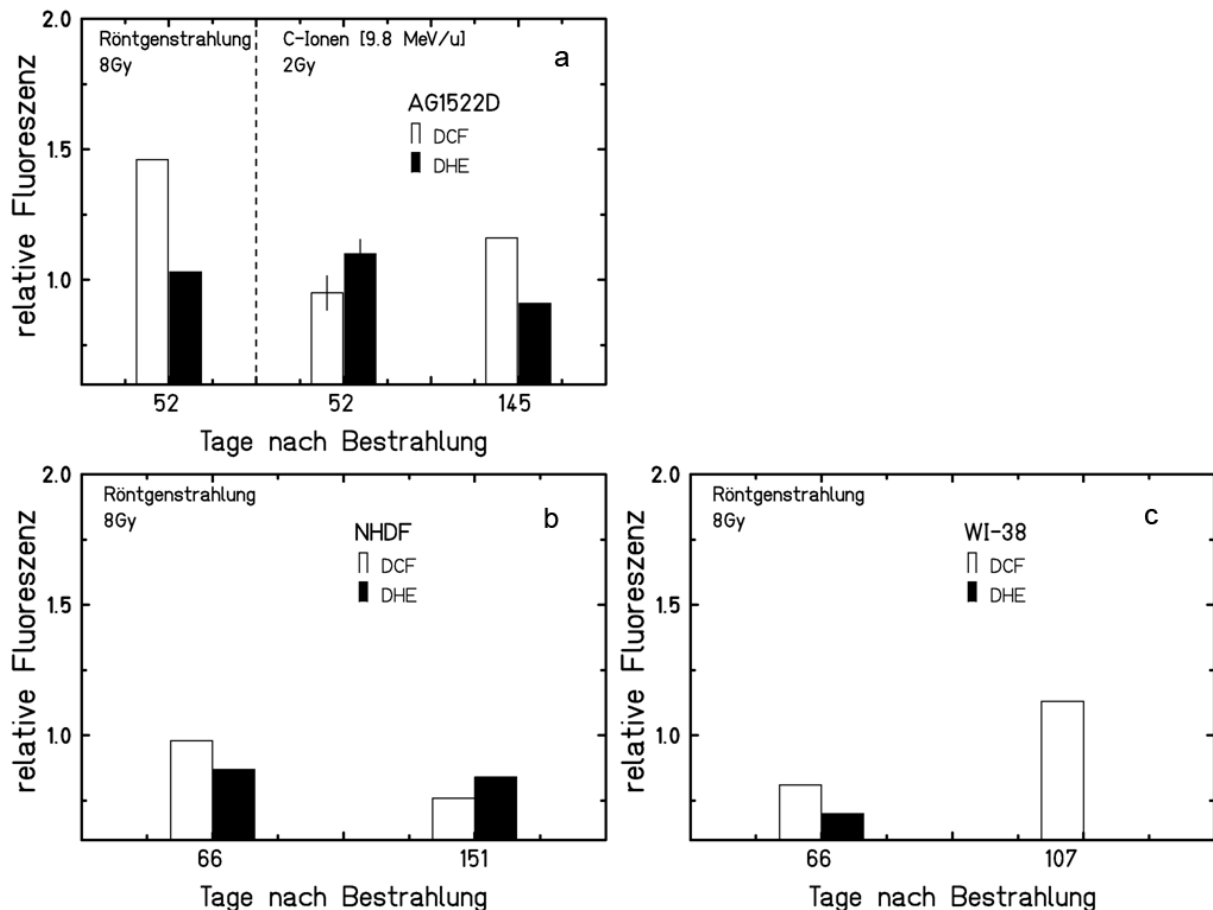
##### 3.3.5 Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fibroblastenlinien wurde die deutlichste ROS-Akkumulation 3 Tage nach Bestrahlung, meist gefolgt von einem Rückgang auf das Niveau schein-bestrahlter Zellen bis 9 Tage nach Bestrahlung festgestellt. Bei Betrachtung einer Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation sollte untersucht werden, ob es in den Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen im Laufe einer Langzeitkultivierung erneut zu erhöhten ROS-Niveaus im Vergleich zu schein-bestrahlten Zellen kam, die möglicherweise im Zusammenhang mit einer frühzeitigen replikativen Seneszenz (Zahnreich *et al.* 2010) oder genomischer Instabilität (Clutton *et al.* 1996, Kodama *et al.* 2005, Tominaga *et al.* 2004) in den Nachkommen der ursprünglich bestrahlten Zellen stehen.

Für Langzeitkultivierungen bestrahlter Zellen wurde jeweils ein Experiment mit AG1522D-, WI-38- und NHDF-Zellen nach Bestrahlung mit 8 Gy Röntgenstrahlung sowie für AG1522D-Zellen zusätzlich ein Experiment nach Bestrahlung mit 2 Gy niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] durchgeführt. Wie in Abbildung 3.47a dargestellt, zeigten Nachkommen von AG1522D-Zellen, die mit einer Dosis von 8 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, 52 Tage nach Bestrahlung eine annähernd 1,5-fach erhöhte DCF-Fluoreszenz gegenüber der ebenfalls gealterten Kontrollpopulation. Nach einer Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] wurden in den Nachkommen bestrahlter Zellen keine Unterschiede der DCF- und DHE-Fluoreszenzen vor (52 Tage nach Bestrahlung) und nach (145 Tage nach Bestrahlung) dem Erreichen der replikativen Seneszenz im Vergleich zur Kontrollpopulation festgestellt.



#### 4. – Ergebnisse – ROS-Akkumulation nach Bestrahlung



**Abbildung 3.47:** Relative DCF- oder DHE-Fluoreszenzintensitäten in Langzeitkulturen von (a) AG1522D-, (b) WI-38- und (c) NHDF-Zellen nach Bestrahlung mit 8 Gy Röntgenstrahlung oder 2 Gy niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] im Verhältnis zur Kontrollpopulation. Es lagen Analysenzeitpunkte vor (52/66 Tage nach Bestrahlung) sowie nach (145/151/107 Tage nach Bestrahlung) dem Erreichen der Seneszenz vor.

In den Abbildungen 3.47b und c sind die Ergebnisse für WI-38- und NHDF-Zellen dargestellt. Es konnte für beide Fibroblastenlinien in den Nachkommen der ursprünglich mit 8 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen, zu jeweils einem analysierten Zeitpunkt vor und nach Erreichen der replikativen Seneszenz, keine signifikanten Unterschiede der DCF- und DHE-Fluoreszenzintensitäten zu den Kontrollpopulationen festgestellt werden. Für eine Messung der NHDF-Zellen in diesen Experimenten wurde in den seneszenten Nachkommen der mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen sowie in der gealterten Kontrollpopulation eine 3-fach erhöhte DCF- und DHE-Fluoreszenzintensität im Vergleich zu nicht-bestrahlten jungen Zellen beobachtet (nicht gezeigt). Die Ergebnisse weisen damit auf eine allgemeine ROS-Akkumulation in Fibroblasten über die Kultivierungsdauer, wie bereits unter Abschnitt 3.1 für verschiedene nicht bestrahlte Fibroblastenlinien beschrieben, unabhängig von einer vorangegangenen Bestrahlung der Zellen hin.

##### **Zusammenfassung der ROS-Akkumulation nach Bestrahlung**

Die höchste strahlungsabhängige intrazelluläre ROS-Akkumulation konnte in den für diese Untersuchungen verwendeten Lungen- und Vorhautfibroblasten (IMR-90, WI-38 und AG1522D), unabhängig vom Ursprungsgewebe oder Spender sowie für alle Strahlenqualitäten, 3 Tage nach der Bestrahlung gezeigt werden. Das Kontrollniveau wurde in den meisten Fällen 9 Tage nach der Bestrahlung wieder erreicht. Für die verwendeten ROS-spezifischen Fluorochrome DCFH-DA und DHE und damit den detektierten Radikalspezies wurden nur sehr schwache Unterschiede in den erreichten Fluoreszenzintensitäten wie auch der zeitlichen Entwicklung in bestrahlten Zellen und deren Nachkommen beobachtet. Die höchsten Fluoreszenzintensitäten beider Fluorochrome wurden meist nach einer Bestrahlung mit niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] in allen untersuchten Fibroblastenlinien festgestellt. Die Unterschiede zwischen einer Bestrahlung mit hochenergetischen Kohlenstoff-Ionen [100 MeV/u] und Röntgenstrahlung waren wenig ausgeprägt. Für eine Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation in Nachkommen bestrahlter Zellen über mehrere Monate nach der Bestrahlung, wurden keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollpopulationen festgestellt.

## 4. Diskusssion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten ohne jegliche Einwirkung ionisierender Strahlung sowie nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung [250 kV] oder Kohlenstoff-Ionen unterschiedlicher Energien [4,8 MeV/u; 9,8 MeV/u; 100 MeV/u].

Fibroblasten zeigen eine zeitlich begrenzte replikative Lebensspanne, die mit dem Beenden der Teilungsaktivität, der sogenannten replikativen Seneszenz endet (Hayflick und Moorhead 1961) und stellen damit einen streng regulierten Zelltyp dar. Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit richtete sich auf Faktoren, die diese strikt regulierte Entwicklung beeinflussen und vor allem zu chromosomalen Instabilitäten führen. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit neben der zytogenetischen Langzeitentwicklung ebenso die zeitliche Entwicklung der Proliferation, Proteinexpression sowie intrazellulärer ROS-Mengen untersucht.

Es wurde vor allem der Einfluss einer Bestrahlung mit dicht- wie auch dünn-ionisierender Strahlung betrachtet. Eine genaue biologische Kenntnis verschiedener Strahlenqualitäten ist für eine Abschätzung des Risikos von Spätkomplikationen aufgrund der Anwendung in der Tumorthherapie und der Bedeutung für den Strahlenschutz notwendig. Ziel dieser Arbeit war daher, Mechanismen, die bei unterschiedlichen Strahlenqualitäten im Zusammenhang mit einer strahleninduzierten genomischen Instabilität in den Nachkommen bestrahlter Fibroblasten diskutiert werden, miteinander zu vergleichen. Den dabei ablaufenden Vorgängen wird eine große Bedeutung bei der Entstehung von Spätkomplikationen einer Strahlenexposition beigemessen.

Da bereits Hinweise auf eine alterungsbedingte genomische Instabilität in normalen humanen Fibroblasten vorliegen (Benn 1976, Dugan und Bedford 2003, Fournier *et al.* 2007), deren Ursprung teilweise auf eine Beeinträchtigung der Telomerstrukturen mit zunehmendem zellulärem Alter zurückgeführt wird, aber bisher nicht umfassend geklärt ist, wurden zuerst nicht bestrahlte Fibroblasten diesbezüglich untersucht.

#### 4.1 Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

Im folgenden Abschnitt wird die Entwicklung der in dieser Arbeit über den Zeitraum ihrer Lebensspanne untersuchten normalen humanen Fibroblastenlinien NHDF, IMR-90 und AG1522D aus den Ursprungsgeweben Haut, Lunge und Vorhaut diskutiert, und zwar zunächst ohne Einfluss von Bestrahlung.

##### 4.1.1 Proliferation normaler humaner Fibroblasten in Langzeitkulturen

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Proliferationsverhalten bis zum Eintritt in die replikative Seneszenz lässt sich in verschiedene Phasen einteilen: Nach einer ersten Phase mit hoher Proliferationsaktivität wurde mit fortschreitender Kultivierungsdauer und Zunahme der Anteile postmitotischer Zellen ein Rückgang der Teilungsaktivität beobachtet, die schließlich in eine Plateau-Phase überging, in der es zu keiner Zunahme von PDs mehr kam. Diesen Übergang bezeichnet man als replikative Seneszenz. Die Anzahl der durchlaufenen PDs aller Experimente lag zwischen 39 und 55 und war damit mit anderen Beobachtungen, die zwischen 45-70 PDs liegen (Benn 1976, Hayflick 1965, Thompson und Holliday 1975), vergleichbar. In allen Fällen, auch wenn es sich um Wiederholungsexperimente mit der gleichen Fibroblastenlinie handelte, unterschieden sich die zeitliche Ausdehnung der Phase aktiver Proliferation, damit der Zeitpunkt des Eintritts in die replikative Seneszenz und die Anzahl erreichter PDs (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1:** Mittlere Werte der Tage nach Beginn der Kultivierung und maximal erreichten PDs zum Zeitpunkt des Einsetzens der replikativen Seneszenz aller Experimente der untersuchten Fibroblastenlinien aus der vorliegenden Arbeit. Die mittleren Abweichungen mit Standardfehlern bezüglich des Einsetzens der replikativen Seneszenz und der maximal erreichten PDs zwischen Wiederholungsexperimenten (NHDF, IMR-90) sind angegeben.

Fibroblastenlinie (Anzahl der Exp.)/ Erreichen der Seneszenz	NHDF (N = 3)	IMR-90 (N = 3)	AG1522D (N = 1)
Tage nach Beginn der Kultivierung	350 ( $\pm$ 42)	93 ( $\pm$ 17)	110
Unterschiede zw. Experimenten (Tage)	200 ( $\pm$ 41)	60 ( $\pm$ 15)	-
Maximal erreichte PDs	(49 $\pm$ 4)	44 ( $\pm$ 2)	42
Unterschiede zw. Experimenten (PDs)	16 ( $\pm$ 3,7)	6 ( $\pm$ 1,5)	-

Obwohl in Hautfibroblasten (NHDF) die Proliferationsphase am längsten war, korreliert diese im Vergleich mit den Fibroblasten der Lunge (IMR-90) oder der Vorhaut (AG1522D) weder mit dem Alter des Spenders noch mit dem Entwicklungsstadium der Zellen (fötal, neonatal).

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

Vergleichbare Unterschiede wurden von Tamm *et al.* (Tamm *et al.* 1984) für die Kultivierung von 5 Hautfibroblastenlinien von Spendern unterschiedlichen Alters (fötal bis 66 Jahre) in jeweils 4 unabhängigen Experimenten beobachtet. Während der Langzeitkultivierung fötaler Lungenfibroblasten (IMR-90) wurde von Unterschieden der maximal erreichten PDs von bis zu 20 berichtet (Britt-Compton *et al.* 2009, Chen *et al.* 1995, Forsyth *et al.* 2003, Ouellette *et al.* 1999, Saito *et al.* 1995). Diese sind nicht auf unterschiedliche Kultivierungsbedingungen wie Passagenrhythmus oder Serumkonzentrationen zurückzuführen.

Die deutlichste Proliferationsaktivität der vorliegenden Arbeit wurde in Experimenten mit NHDF-Zellen festgestellt, in denen es zur Expansion von Zellen mit klonalen Aberrationen kam. In Experimenten mit IMR-90-Zellen wurde ebenfalls eine Expansion von Zellen mit klonalen Aberrationen beobachtet, die in zwei Experimenten sogar vergleichbare Muster zeigten. Diese Zellen expandierten deutlich und hatten damit Selektionsvorteile in den betroffenen Populationen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass Populationsdynamiken als Selektion von Subpopulationen mit proliferativen Vorteilen deutlich zu den Unterschieden der Länge der replikativen Lebensspanne einer Fibroblastenlinie in unterschiedlichen Experimenten beitragen. Für eine klonale Selektion von Zellen in Massenkulturen liegen Ergebnissen von McCarron *et al.* (McCarron *et al.* 1987) aus Langzeitkulturen humaner Lymphozyten vor, die sich über eine Kultivierungsdauer von 300 Tagen aus polyklonalen über oligoklonale zu monoklonalen Populationen entwickelten. Gegen Ende der Kultivierung dominierten in den Lymphozytenkulturen damit Zellen mit selektiven Vorteilen, die nicht mehr die Eigenschaften der ursprünglichen Gesamtpopulation hatten. Für Fibroblastenpopulationen liegen ebenfalls Hinweise auf klonale Selektion und Expansion von Zellen mit einer verlängerten replikativen Lebensspanne aus frühen Arbeiten vor (Duthu *et al.* 1982, Poiley *et al.* 1978). Auf eine allgemein sehr ausgeprägte Heterogenität des Proliferationspotentials von Fibroblasten weisen auch Untersuchungen klonaler Nachkommen isolierter Einzelzellen hin, für die deutliche Unterschiede des replikativen Potentials festgestellt wurden (Absher und Absher 1976, Bell *et al.* 1978, Cristofalo und Sharf 1973, Martin *et al.* 1974, Merz und Ross 1973, Rabinovitch 1983, Smith und Hayflick 1974, Smith und Whitney 1980). Das höchste Proliferationspotential dieser isolierten Einzelzellen entsprach den Gesamtpopulationen denen sie entstammten (Smith und Hayflick 1974). Diese Beobachtungen verdeutlichen die Heterogenität von Fibroblastenpopulationen bezüglich des Proliferationspotentials einzelner Zellen und lassen auf eine Selektion der Zellen mit den längsten replikativen Lebensspannen zu späten Zeitpunkten der Kultivierung schließen. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich dabei häufig um klonal expandierende Zellen mit zytogenetischen Aberrationen handelt.

**Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit für alle untersuchten Fibroblastenlinien eine für diesen Zelltyp charakteristische Entwicklung der Proliferationsaktivi-**

**tät mit teilungsaktiver Wachstumsphase und replikativer Seneszenz beobachtet. Deutliche Unterschiede der Proliferationsaktivitäten zwischen den Experimenten der jeweiligen Linien lassen sich teilweise auf klonale Subpopulationen zurückführen, die das Proliferationspotential der jeweiligen Populationen deutlich beeinflussten.**

#### **4.1.2 Zytogenetische Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten**

Die zytogenetische Entwicklung der unterschiedlichen Fibroblasten wurde in der vorliegenden Arbeit über die gesamte teilungsaktive Phase der Kultivierungsdauer verfolgt. Das Hauptaugenmerk richtete sich dabei auf chromosomale Instabilität und die Entwicklung klonaler Aberrationen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass es in zwei von drei untersuchten Fibroblastenlinien (NHDF- und IMR-90) zu einem Anstieg struktureller chromosomaler Aberrationen während der Kultivierungsperiode kam (siehe Abschnitt 3.1.1/2). Dabei handelte es sich meist um dizentrische Chromosomen, die nicht von azentrischen Fragmenten begleitet wurden, sowie Chromosomen- und Chromatidbrüche. Beide Gruppen von Aberrationstypen gelten als Indikatoren für chromosomale Instabilität. Dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente treten meist am Ende der replikativen Lebensspanne von Fibroblasten auf und gehen aus Fusionen von Chromosomen mit erodierten und dysfunktionalen Telomeren hervor (Murnane und Sabatier 2004). Chromatidbrüche gelten allgemein als Indikator für genomische Instabilität, da sie während des Zellzyklus entstehen, der vor der analysierten Mitose durchlaufen wurde, d.h. in der späten S- oder G2-Phase.

In IMR-90-Zellen wurde nur eine leichte Zunahme von Metaphasen mit sporadischen Aberrationen bis zum Erreichen der Seneszenz festgestellt (maximal auf 24 %, Abbildung 3.11), was sich mit Literaturdaten deckt (Sherwood *et al.* 1988), während für andere Lungenfibroblasten (WI-26, WI-38, MRC5) eine deutlich höhere Zunahme der Anteile aberranter Metaphasen (40-70 % der analysierten Metaphasen) festgestellt wurde (Benn 1976, Saksela und Moorhead 1963, Thompson und Holliday 1975). In Bezug auf das Auftreten vererbbarer Aberrationen in IMR-90-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal eine charakteristische Entwicklung beobachtet. Im Laufe der Kultivierung kam es zu einer deutlichen Zunahme von Translokationen bzw. Duplikationen, die sich auf die Instabilität eines Chromosoms (Chromosom 9) zurückführen ließen (siehe Abschnitt 3.1.2.3). Die mit den Duplikationen einhergehende Stabilisierung des Karyotyps führte zu einer deutlichen klonalen Expansion dieser Zellen in den Populationen, worauf in Abschnitt 4.1.2.3.2 näher eingegangen wird.

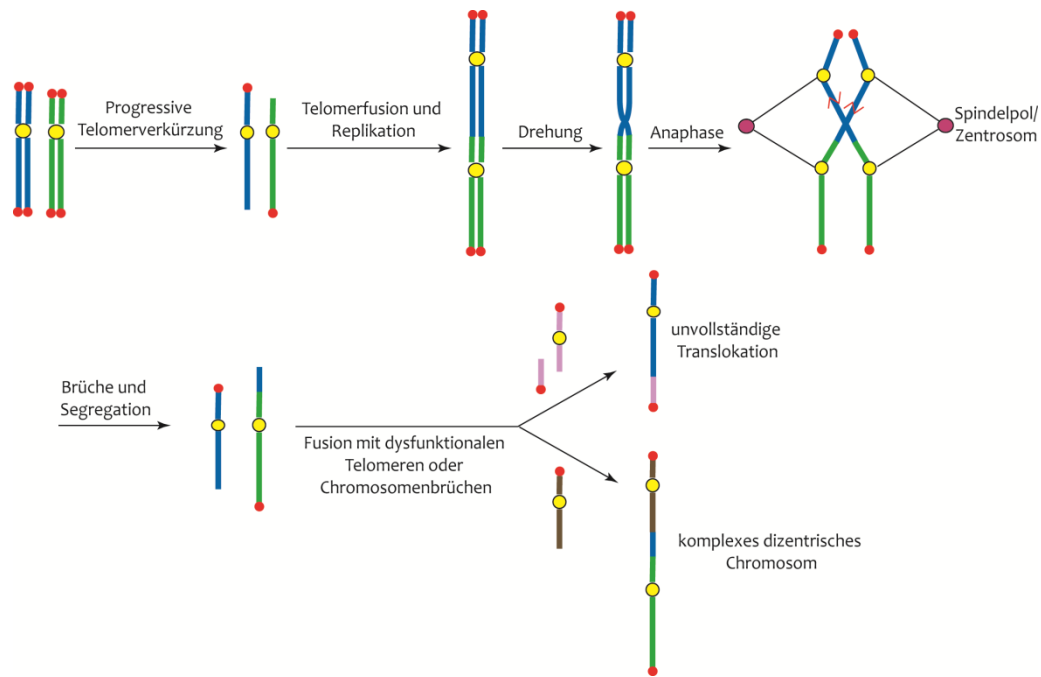
Im Gegensatz zur zytogenetischen Entwicklung der IMR-90-Zellen kam es in allen Experimenten mit NHDF-Zellen bereits zu mittleren Zeitpunkten der Kultivierung (PD 25-35) zu einem deutlichen Anstieg von Zellen mit aberranten Metaphasen (Abbildung 3.2). Dabei traten

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

fast ausschließlich Chromatidtyp-Aberrationen auf, was auf eine ausgeprägte genomische Instabilität dieser Zellen hinweist. Die Rate an Chromatidtyp-Aberrationen aller Experimente ging zu späteren Zeitpunkten der Kultivierung wieder auf das Niveau junger Zellen zurück und stieg nur für ein Experiment (1) mit dem Erreichen der Seneszenz wieder an. Chromatidtyp-Aberrationen führen bei der Segregation der aberranten Chromosomen auf die Tochterzellen meist zu trunkierten oder dizentrischen Chromosomen sowie Translokationen (siehe Abschnitt 2.3.3.11 und (Savage 1976)). Diese wurden in NHDF-Zellen kurz nach dem Zeitpunkt des Auftretens der Chromatidtyp-Aberrationen allerdings nicht beobachtet, was auf eine direkte Eliminierung der aberranten NHDF-Zellen durch Zelltod oder Seneszenz hinweist. Damit wurde in NHDF-Zellen eine erste Phase genomischer Instabilität beobachtet, die zu einer Selektion genomisch stabilerer Zellen führte.

Trotzdem kam es in zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz in allen Experimenten mit NHDF-Zellen zu einer erneuten Zunahme aberranter Zellen. Zu diesem Zeitpunkt traten aber hauptsächlich dizentrische Chromosomen ohne azentrische Fragmente auf. Da in allen Experimenten mindestens 80 % der dizentrischen Chromosomen nicht von azentrischen Fragmenten begleitet wurden, ist der wahrscheinlichste Entstehungsmechanismus die Fusion dysfunktionaler Telomere. Es traten auch unvollständige Translokationen und komplexe Aberrationen auf, die aus dizentrischen Chromosomen bei der Segregation durch die Bildung von Chromatinbrücken („Anaphasebrücken“), die zu sogenannten „breakage-fusion-bridge“-Zyklen (BFB, (Bailey *et al.* 2004, McClintock 1941)) führen, entstehen können. Dabei kommt es zu Brüchen innerhalb der beteiligten Chromosomen, die in den Tochterzellen als unvollständige Translokation und terminale Deletionen vorliegen (Artandi *et al.* 2000, Murnane 2006a, Murnane und Sabatier 2004, Atkin 1986, Gisselsson 2001, Gisselsson *et al.* 2001). Diese führen durch erneute Fusionen mit dysfunktionalen Telomeren oder DNA-Doppelstrangbrüchen zu weiteren BFB-Zyklen, damit andauernder genomischer Instabilität und komplexen Aberrationen (Murnane 2006b). Der Ablauf von BFB-Zyklen ist schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten



**Abbildung 4.1:** Dysfunktionale Telomere führen zu BFB-Zyklen und genomischer Instabilität. Erodier- te und dysfunktionale Telomere von zwei Chromosomen fusionieren in der G1-Phase des Zellzyklus und es entsteht ein dizentrisches Chromosom. Nach Replikation und Erreichen der Anaphase verur- sacht dieses eine Chromatinbrücke bei der Segregation und es kommt zu meist zufällig lokalisierten Brüchen im dizentrischen Chromsom. In den Tochterzellen liegen damit Chromsomen mit Doppel- strangbrüchen vor, die erneut mit dysfunktionalen Telomeren oder Chromosomenbrüchen fusionieren. Modifiziert nach Soler *et al.* (Soler *et al.* 2005). (rot – Telomer, gelb – Zentromer).

Auffallend war, dass in NHDF-Zellen des Experiment 1 mit der höchsten Aberrationsrate eine stark expandierende klonale Translokation (4'-17) auftrat. Dabei lag das an der Translokation beteiligte Fragment von Chromosom 17 (17q21.3-ter) dupliziert vor (Abbildung 3.6). In die- sen Zellen kam es zu späteren Zeitpunkten zusätzlich zu einer Monosomie für Chromosom 6. Der mögliche Mechanismus, der zu der Duplikation geführt haben könnte sowie der Bei- trag der klonalen Aberrationen zu einem selektiven Vorteil der Zellen und genomischer In- stabilität werden in Abschnitt 4.1.2.3 diskutiert.

Eine andauernde Proliferation der NHDF-Zellen trotz deutlicher genomischer Instabilität lässt auf eine weniger restriktive Regulierung der Zellzyklusprogression im Vergleich zu den ande- ren Fibroblasten schließen (siehe Abschnitt 3.1.1.2). In diesem Zusammenhang war auffällig, dass in NHDF-Zellen zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung das Tumorsuppressorprotein p53 detektiert werden konnte und die zellulären Mengen anderer, für die Seneszenz essentieller CDK-Inhibitoren wie p21 oder p16, meist nur schwach über die Kultivierungsdauer anstiegen (Abbildung 3.8a). Nach einer Bestrahlung junger NHDF-Zellen mit Röntgenstrahlung wurden allerdings höhere intrazelluläre Mengen des CKD-Inhibitors p21 detektiert (Abbildung 3.8d). Dies weist darauf hin, dass p53-abhängige Signaltransduktionswege als Folge von DNA- Schäden trotzdem in diesen Zellen aktiv sind, eventuell auch über redundante und p53- unabhängige Wege, was in Abschnitt 4.1.3 diskutiert wird.



**In der vorliegenden Arbeit wurde damit in zwei von drei untersuchten Fibroblastenlinien (IMR-90, NHDF) genomische Instabilität festgestellt. Diese trat in Experimenten mit beiden Fibroblastenlinien einerseits als Zunahme der Anteile von Zellen mit instabilen Aberrationen, und andererseits durch die Entstehung und Expansion klonaler Aberrationen auf. Die genetischen Veränderungen, die zu den Selektionsvorteilen der Zellen mit klonalen Aberrationen in den Populationen geführt haben können, werden in Abschnitt 4.1.3 diskutiert.**

#### **4.1.2.1 Tetraploidie in normalen humanen Fibroblasten**

Eine weitere zytogenetische Veränderung, die in der vorliegenden Arbeit mit zunehmendem zellulärem Alter und Erreichen der Seneszenz in zwei der Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90) beobachtet wurde war das Auftreten von Tetraploidie, d.h. einem vierfachen DNA-Gehalt (4N).

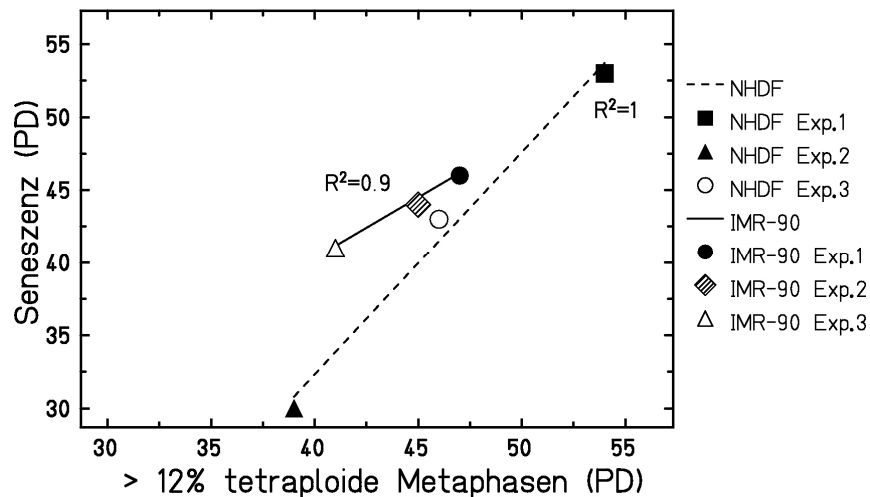
Tetraploidie und weitere Vielfache des normalen DNA-Gehaltes (Polyploidie) kommen in verschiedenen Normalgeweben vor (Biesterfeld *et al.* 1994). Tetraploidie wird dabei in metabolisch sehr aktiven Geweben als ein Schutzmechanismus diskutiert, der in einer Redundanz des genetischen Materials besteht. Außerdem geht Polyploidie, z.B. in Hepatozyten oder auch Megakaryozyten, mit der Differenzierung der Zellen einher (Edgar und Orr-Weaver 2001) und wird im Zusammenhang mit einer Steigerung der metabolischen Aktivität und einer Erhöhung der Zellmasse diskutiert (Schwarze *et al.* 1984).

Tetraploidie trat in jungen Zellen aller Fibroblastenlinien in maximal 12 % der analysierten Metaphasen auf. Mit Erreichen der replikativen Seneszenz verdoppelte sich der Anteil tetraploider Metaphasen in NHDF- und IMR-90-Zellen. Ähnliche Werte wurden für IMR-90-Zellen berichtet (Sherwood *et al.* 1988), während die Angaben für verschiedene Lungenfibroblasten stark variieren, und zwar zwischen 5 und 60 %, (Benn 1976, Saksela und Moorhead 1963), was vermutlich auch die Schwankungsbreite von Einzelexperimenten einschließt.

Im Gegensatz zu NHDF- und IMR-90-Zellen kam es nach unseren Beobachtungen in AG1522D-Zellen zu keiner Zunahme von tetraploiden Metaphasen während der Dauer der Kultivierung, was mit anderen Befunden zu Vorhautfibroblasten übereinstimmt (Zahnreich *et al.* 2010, Wagner *et al.* 2001) und damit auf eine charakteristische Eigenschaft dieses Zelltyps hinweist.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ein eindeutiger zeitlicher Zusammenhang zwischen der Zunahme von Tetraploidie und dem Erreichen der replikativen Seneszenz feststellen. In Abbildung 4.2 ist die Korrelation der Zeitpunkte des Einsetzens der replikativen Seneszenz und der Zunahme tetraploider Metaphasen für NHDF- und IMR-90-Zellen der vorliegenden Arbeit über einen Schwellenwert junger Fibroblasten von 12 % dargestellt.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten



**Abbildung 4.2:** Korrelation erreicher PDs zu den jeweiligen Zeitpunkten der replikativen Seneszenz und dem Anteil tetraploider Zellen, der über den Anteil tetraploider Metaphasen in jungen NHDF- und IMR-90-Zellen hinausgeht, berechnet als der Mittelwert junger Zellen + 1 Standardabweichung. Der Schwellenwert liegt in beiden Fällen bei 12 %. Das jeweilige Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) ist angegeben (Zahnreich *et al.* 2010).

Das zeitgleiche Auftreten von Polyploidie und Seneszenz in Fibroblasten wurde bereits früh mit einer Aktivierung der intrinsischen Zellzykluskontrolle in Verbindung gebracht (Wright und Hayflick 1972). Dennoch ist unklar, ob Polyploidie ursächlich zu irreversibler Zellzyklusinhibition und damit Seneszenz in diesen Zellen führt, oder die Veränderungen zeitgleich auftreten. Eindeutige Aussagen werden meist dadurch erschwert, dass tetraploide Zellen mit sogenannten „Spindelgiften“ wie Cytochalasinen (Carter 1967), welche die Zytokinese verhindern und dadurch binukleäre Zellen akkumulieren, erzeugt werden. In Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration dieser Agentien wird das gesamte zelluläre Zytoskelett geschädigt, was zu einem von der Tetraploidie unabhängigen Zellzyklusarrest führen kann (Uetake und Sluder 2004). In humanen Zellen wurde bei unvollständiger Zytokinese und daraus resultierender Tetraploidie allerdings kein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus beobachtet, was darauf hinweist, dass tetraploide Fibroblasten weiterhin proliferieren können (Guidotti *et al.* 2001, Uetake und Sluder 2004, Wong und Stearns 2005, Guidotti *et al.* 2003, Thompson und Holliday 1978). Die Schritte, die zu einer spontanen Tetraploidie in Fibroblasten führen, sind bisher allerdings nicht eindeutig geklärt. Die diskutierten Mechanismen sind die Fusion von Zellen, das Überspringen der Zytokinese oder deren Abbruch (Übersicht in: Ganem *et al.* 2007, Hassold *et al.* 2007)). Chromosomale Aberrationen, speziell dizentrische Chromosomen, können ebenfalls zur Entstehung tetraploider Zellen beitragen. Dizentrische Chromosomen und daraus resultierende Anaphasebrücken können zu einem Abbruch der Zytokinese und damit binukleären Zellen führen (Mullins und Biesele 1977, Stewenius *et al.* 2005, Shi und King 2005, Weaver *et al.* 2006, Ichijima *et al.* 2010). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergibt sich ein solcher Zusammenhang nicht eindeutig aus allen Experimenten. Obwohl es in allen Experimenten mit NHDF-Zellen mit Erreichen der Seneszenz zu einer deutlichen Zunahme von Zellen mit dizentrischen Chromosomen kam, wurde Tetrap-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

loidie nur in drei von vier Experimenten beobachtet. Für IMR-90-Zellen gibt es gar keinen entsprechenden Zusammenhang. Es sind demnach noch andere Mechanismen, die zum Auftreten von Tetraploidie in Fibroblasten beim Erreichen der Seneszenz führen, verantwortlich.

**Insgesamt wurde damit in Experimenten mit IMR-90- und NHDF-Zellen ungefähr zum Zeitpunkt des Eintritts in die replikative Seneszenz ein Auftreten tetraploider Zellen beobachtet. Literaturdaten zeigen, dass Tetraploidie in Fibroblasten keine direkte Ursache für einen Zellzyklusarrest und damit für einen Eintritt in die Seneszenz ist. Die Zunahme tetraploider Metaphasen zeigte sich auch unabhängig vom Ausmaß chromosomaler Schäden und ließ sich nicht auf spezifische chromosomale Aberrationen zurückführen. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint Tetraploidie in Fibroblasten, sofern sie auftritt, mit fortschreitender Differenzierung und damit zunehmender Stoffwechselaktivität einherzugehen.**

##### 4.1.2.2 Aneuploidie in normalen humanen Fibroblasten

Als eine weitere zytogenetische Veränderung wurde in Fibroblasten mit zunehmendem Alter eine bestimmte Form von Aneuploidie, nämlich der Verlust von Chromosomen, also Hypodiploidie beobachtet. *In vivo* treten Aneuploidien fast ausschließlich als ein Zugewinn von Chromosomen auf. Diese stehen im Fall von Trisomien der Chromosomen 13, 18, oder 21 in Verbindung mit schweren und erblich bedingten Krankheiten. Trisomien anderer Chromosomen führen im embryonalen Stadium zu einem frühzeitigen Abort. Dies gilt *in vivo* auch für den Verlust von Chromosomen. Nicht lethal ist hingegen das Turner-Syndrom, bei dem es zur Monosomie, d.h. dem klonalen Verlust eines der X-Chromosomen im weiblichen Genom kommt (Kesler 2007). Einem Verlust der Heterozygotie, d.h. eines der homologen Chromosomen und damit auch bestimmter Gene, werden Auswirkungen auf die Mengen der Gen-Produkte, d.h. RNA und Proteine, vor allem für Tumorsuppressorgene zugeschrieben (Pollack *et al.* 2002, Upender *et al.* 2004, Tsafrir *et al.* 2006). Dies bedeutet für die betroffenen Zellen meist Selektionsvorteile gegenüber normalen Zellen (Duesberg 2007).

Während in Experimenten der vorliegenden Arbeit in AG1522D- und IMR-90-Zellen nur eine geringe Zunahme aneuploider Metaphasen während der Phase aktiver Proliferation bis zum Eintritt in die Seneszenz festgestellt wurde (Abbildung 3.11, 3.21), kam es in NHDF-Zellen zeitgleich mit dem Auftreten struktureller Aberrationen zu einer drastischen Zunahme von aneuploiden Metaphasen (Abbildung 3.2).

Für Fibroblasten liegen Literaturdaten vor, die eine Zunahme aneuploider Metaphasen mit dem Erreichen der Seneszenz zeigen (Sherwood *et al.* 1988, Benn 1976, Saksela und

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

Moorhead 1963, Thompson und Holliday 1975). Hohe Anteile aneuploider Zellen (40-70 %) gingen in diesen Arbeiten ebenfalls mit strukturellen Aberrationen und speziell der Bildung dizentrischer Chromosomen einher (Benn 1976, Saksela und Moorhead 1963, Thompson und Holliday 1975). Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit in Experimenten mit NHDF-Zellen ebenfalls beobachtet. Die Bildung dizentrischer Chromosomen wird daher als ein Mechanismus betrachtet, der zu hohen Verlustraten von Chromosomen führt (Gisselsson und Hoglund 2005). Dies geschieht dadurch, dass es bei der Segregation auf die Tochterzellen in dizentrische Chromosomen meist zu Brüchen kommt und diese fragmentieren (siehe Abbildung 4.1). Kommt es im Anschluss weiterhin zu Zellteilungen, kann es zu Verlusten der chromosomalen Fragmente kommen (Norppa und Falck 2003, Stewenius *et al.* 2005, Pampalona *et al.* 2010). Die hohen chromosomalen Verlustraten in Experimenten mit NHDF-Zellen der vorliegenden Arbeit, in bis zu über 90 % der Metaphasen, stellen damit eine Folge der genomischen Instabilität in diesen Zellen dar.

Aneuploidie wurde in AG1522D- und IMR-90-Zellen allerdings auch ohne zeitgleiches Auftreten dizentrischer Chromosomen beobachtet, wenn auch im Vergleich zu NHDF-Zellen in geringeren Anteilen von Zellen. Dies weist auf weitere Ursachen für Aneuploidie mit zunehmender Kultivierungsdauer hin, was unter Umständen auch die Situation im Organismus widerspiegelt. So wurden in Hautfibroblasten älterer Spender (> 90 Jahre) im Vergleich zu jungen Spendern (< 10 Jahre) mittels Interphase-FISH ebenfalls erhöhte Aneuploidieraten ohne eine zeitgleiche Zunahme struktureller chromosomaler Aberrationen festgestellt (Geigl *et al.* 2004). Gen-Expressionsanalysen aus der gleichen Arbeit sowie von Ly *et al.* (Ly *et al.* 2000) zeigten in Fibroblasten älterer Spender deutlich niedrigere Expressionsniveaus von Genen, die am Kinetochoraufbau (CENP-A/E/F, MCAK, HKSP, HMG-2, Ran BP-1) oder dem Spindelapparat (ACTRIB, UNC84B und CCNB1) beteiligt sind. Andere Studien kommen zu ähnlichen Ergebnissen (Musio *et al.* 2003, Gjoerup *et al.* 2007). Für die am Kontrollpunkt des Spindelapparates beteiligte Bub1-Kinase zeigten Gjoerup *et al.* (Gjoerup *et al.* 2007) in seneszenten humanen Lungenfibroblasten (IMR-90, WI-38) im Vergleich zu jungen Zellen ebenfalls einen Rückgang des Expressionsniveaus. Die Behandlung junger IMR-90- und WI-38-Zellen mit Bub1 siRNA führte in deren Arbeit zu einer p53-abhängigen frühzeitigen Seneszenz, während in p53-defizienten und Telomerase exprimierenden Vorhautfibroblasten (tertBJ) kein Zellzyklusarrest und deutlich höhere Anteile von Zellen mit Chromosomenverlusten (>60 %) im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet wurden. Eine mit dem zellulären Alter von Fibroblasten zunehmende Beeinträchtigung der Funktionalität des Kinetochorkomplexes und Spindelapparates könnte daher ebenfalls zu einer steigenden spontanen Missegregations- und damit Aneuploidierate in seneszenten Fibroblasten führen. Thompson und Compton (Thompson und Compton 2010) stellten in diesem Zusammenhang in Tumorzellen und normalen humanen Fibroblasten nach induzierter Aneuploidie durch Monastrol

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

eine deutlich verminderte Koloniebildungsfähigkeit und erhöhte zelluläre Mengen der zellzyklusinhibierenden Proteine p53, p38 und p21 fest, die maßgeblich an der Seneszenz von Fibroblasten beteiligt sind. In diesen Zellen wurde ebenfalls durch Behandlung mit siRNA die p53-Funktion ausgeschaltet, was zu andauernder Proliferation aneuploider Zellen und in den folgenden Generationen zu genomischer Instabilität führte. Interessanterweise konnte in NHDF-Zellen der vorliegenden Arbeit, bei zeitgleichem Auftreten hoher Chromosomenverluste, genomischer Instabilität und andauernder Proliferation das Tumorsuppressorprotein p53 nicht detektiert werden. Diese Beobachtung bestätigt einen möglichen Zusammenhang zwischen genomischer Instabilität, Chromosomenverlusten und einer veränderten Zellzyklusregulierung in NHDF-Zellen.

**Zusammengenommen kam es in der vorliegenden Arbeit in allen Fibroblastenlinien zu Chromosomenverlusten in zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz. Bei relativ geringen Verlustraten ist dies wahrscheinlich auf eine Beeinträchtigung der Segregation von Chromosomen mit zunehmendem zellulärem Alter zurückzuführen. Die Chromosomenverluste tragen dabei möglicherweise über eine zusätzliche Aktivierung von p53 zum Eintritt in die Seneszenz bei. Zu hohen Aneuploidieraten kam es in Fibroblasten der vorliegenden Arbeit nur in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von dizentrischen Chromosomen, d.h. genomischer Instabilität, und veränderter Zellzyklusregulierung.**

##### 4.1.2.3 Klonale Aberrationen in normalen humanen Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wurde in Experimenten mit zwei Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90) eine Expansion von Zellen mit klonalen Aberrationen beobachtet. Dass spontan entstandene und klonal expandierende strukturelle Aberrationen während der *in vitro* Kultivierung normaler humaner Fibroblasten auftreten können, ist bereits bekannt (Littlefield und Mailhes 1975, Harnden *et al.* 1976). Da in diesen Arbeiten Chromosomenanalysen nur mittels konventioneller Bänderung durchgeführt wurden, ist allerdings anzunehmen, dass deren Rate und Expansion im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten mFISH-Analysen unterschätzt wurde. Spontan auftretende transmissible Aberrationen und deren klonale Expansion werden vor allem im Zusammenhang mit klonaler Selektion und Diversifikation von Zellen bei der Tumorentstehung diskutiert (Mahale *et al.* 2008, Fialkow 1976, Bedi *et al.* 1996, Teixeira *et al.* 1998). In gesunden Spendern konnten spontan entstandene klonale Aberrationen *in vivo* bisher nur in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden (Johnson *et al.* 1999). In Fibroblasten von humanen Spendern mit genetische bedingten Krankheiten wie der Fanconi Anämie, Li Fraumeni-, Werner- oder Blooms-Syndrom und Xe-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

roderma Pigmentosum, in denen es zu einer Beeinträchtigung der Funktion von DNA-Reparatur- und zellzyklusregulierenden Mechanismen kommt, treten klonale Aberrationen durch chromosomale Instabilitäten jedoch häufiger spontan auf (Scappaticci *et al.* 1982, Berger und Jonveaux 1996, Chessa *et al.* 1990, Hoehn und Salk 1984, Maarek *et al.* 1996, Tonnies *et al.* 2003).

Da in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Aberrationsmuster in den klonal expandierenden Zellen festgestellt wurden, nämlich Monosomien oder Duplikationen, werden diese in den folgenden zwei Abschnitten separat diskutiert.

##### 4.1.2.3.1. Monosomien in normalen humanen Fibroblasten

Monosomien traten in der vorliegenden Arbeit in NHDF-Zellen des Experiments 1 und einer erneuten Kultivierung der Zellen in Experiment 1a hauptsächlich für Chromosom 6 auf (siehe Abschnitt 3.1.1.2, Abbildung 3.5 und 3.7). Die Monosomien führten zu deutlichen selektiven Vorteilen für die betroffenen Zellen in den Populationen und den längsten replikativen Lebensspannen aller durchgeführten Experimente der vorliegenden Arbeit.

Als eine Folge von Trisomien wurde in verschiedenen Zelltypen eine veränderte und in vielen Fällen gesteigerte Expression von Genen und deren Produkte (mRNA, Proteine), die auf diesen Chromosomen lokalisiert sind, beobachtet (Pollack *et al.* 2002, Upender *et al.* 2004, Williams *et al.* 2008). Daher wird im Gegenzug der Verlust der Heterozygotie durch Monosomien mit einer verminderten Expression der betroffenen Gene diskutiert (Santarosa und Ashworth 2004, Payne und Kemp 2005). Betrifft dieser Allelverlust Gene für zellzyklusregulierende Proteine, kann die Zellzykluskontrolle und damit der Zeitpunkt des Eintritts in die Seneszenz der Zellen nachhaltig beeinflusst werden. *In vivo* ist eine Monosomie für ein vollständiges Chromosom lediglich beim sogenannten Turner-Syndrom als Verlust eines X-Chromosoms im weiblichen Genom bekannt (Kesler 2007).

Hinweise aus der Literatur für Monosomien von Chromosom 6 bei *in vitro* Kultivierungen von Fibroblasten, die ebenfalls zu einem selektiven Vorteil und verlängerter replikativer Lebensspanne der Zellen in Massenkulturen führten, liegen für Vorhautfibroblasten (Kehrer-Sawatzki *et al.* 1999, Krone *et al.* 1997) und unter anderem für die Nachkommen ursprünglich mit ionisierender Strahlung bestrahlte Fibroblasten vor (Tsutsui *et al.* 1997, Fournier *et al.* 2007). Dabei war in den Nachkommen der mit einer hohen Röntgendosis bestrahlten Zellen der CDK-Inhibitor p21 nicht mehr detektierbar und es kam zu einer sehr deutlichen genomischen Instabilität in diesen Zellen (Fournier *et al.* 2007). Das Gen für p21 ist, neben Genen anderer Tumorsuppressorproteine, auf Chromosom 6 (6p21) lokalisiert (Knuutila *et al.* 1999). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in Populationen von NHDF-Zellen, die eine Monosomie für Chromosom 6 zeigten, ein Rückgang des Expressionsniveaus von p21 noch vor dem Erreichen der replikativen Seneszenz festgestellt (Abbildung 3.8). Auch andere Pro-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

teine könnten in diesem Fall verändert exprimiert werden, wie in SV40-transformierten humanen Fibroblasten mit einer klonal expandierenden Deletion des q-Arms von Chromosom 6 für die Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) gezeigt wurde (Hoffschir *et al.* 1992, Bravard *et al.* 1992a, Bravard *et al.* 1992b). Der SOD wird eine Beteiligung an der Differenzierung von Fibroblasten und damit auch der Seneszenz zugeschrieben (Allen 1991, Allen und Balin 1988).

Neben der Monosomie für Chromosom 6 wurde in NHDF-Zellen des Experiments 1 zu späten Zeitpunkten der Kultivierung ein überproportional häufiger Verlust eines der Chromosomen 13 beobachtet (bis zu 65 % der analysierten Metaphasen, Abbildung 3.7), was ebenfalls auf eine Monosomie für dieses Chromosom hinweist. Eine Beteiligung von Chromosom 13 an Monosomien wurde bereits in immortalisierten Zellen beobachtet (Kimura *et al.* 2004, Takeuchi *et al.* 2009). Chromosom 13 ist durch die Lokalisation des Rb1-Gen auf diesem Chromosom, kodierend für das Retinomablastom-Protein, und dessen zentraler Rolle in der Zellzyklusregulierung an der Entwicklung einer Vielzahl von Tumoren beteiligt (Latil *et al.* 2002, Forsti *et al.* 2001, Hagstrom und Dryja 1999, Chen *et al.* 2001a).

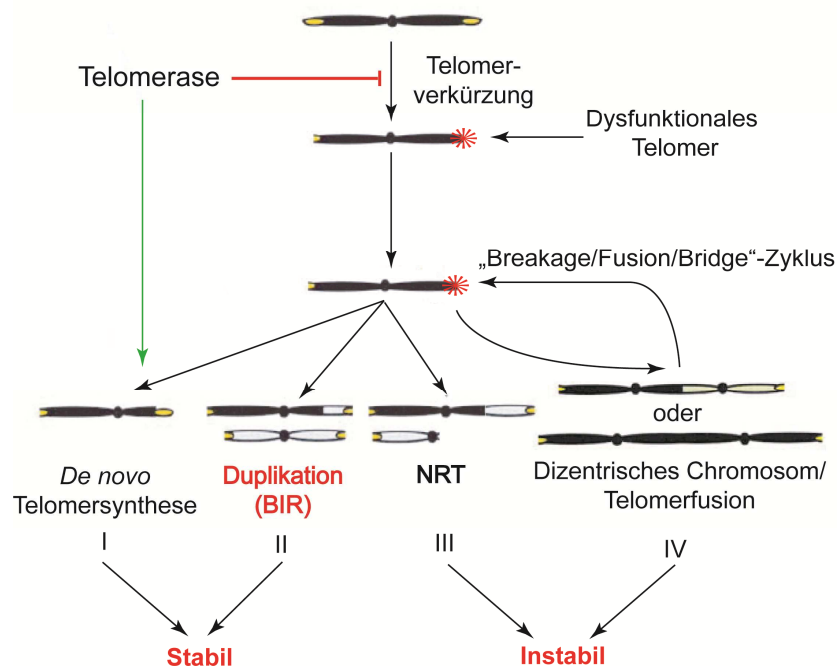
##### 4.1.2.3.2. Duplikationen genetischen Materials in Fibroblasten

Im folgenden Abschnitt werden klonale Aberrationen, die Duplikationen chromosomalen Materials zeigten, besprochen. Diese traten in NHDF- und IMR-90-Zellen in jeweils mindestens einem Experiment und gleichzeitig mit einem deutlichen Selektionsvorteil, d.h. einer verlängerten replikativen Lebensspanne im Vergleich zu Zellen mit normalem Karyotyp auf.

Bei den klonal expandierenden Duplikationen, die in zwei Experimenten mit IMR-90-Zellen beobachtet wurden (siehe Abschnitt 3.1.2.3, Abbildung 3.14 und 3.15), handelt es sich um Duplikationen chromosomaler Fragmente von insgesamt 12 unterschiedlichen Chromosomen, jeweils am distalen Ende des q-Arms eines der homologen Chromosomen 9. Die mBAND-Analyse der Chromosomen 9 in diesen Zellen ergab, dass die an den Aberrationen beteiligten Chromosomen 9 in allen Fällen vollständig waren. Durch Telomer-FISH Analyse wurden Telomersequenzen an den derivatisierten Chromosomen sowohl am Ende des p-Arms von Chromosom 9, als auch am distalen Ende des duplizierten Fragments detektiert. Außerdem wurden kurze interstitielle Telomersequenzen am Fusionspunkt einer Duplikation (9'-1) festgestellt (Abbildung 3.17). Daher sind wahrscheinlich verkürzte und dysfunktionale Telomere am q-Arm eines der homologen Chromosomen 9 an der Entstehung der Duplikationen beteiligt. Unterstützt wird diese Annahme durch eine parallel zu dieser Arbeit durchgeführte quantitative Bestimmung der Telomerlängen (QFISH) in Metaphasen junger IMR-90-Zellen, durch die für den q-Arm eines der homologen Chromosomen 9 relativ zur Gesamtheit aller genomischen Telomersequenzen deutlich kürzere Telomere zeigten (Zahnreich *et al.*, wird eingereicht bei: Molecular and Cellular Biology).

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

Vergleichbare Aberrationsmuster, d.h. Duplikationen chromosomalen Materials an Chromosomen mit dysfunktionalen Telomeren oder DNA-Doppelstrangbrüchen, wurden bereits in Hefezellen (Bosco und Haber 1998, Hackett *et al.* 2001), embryonalen Stammzellen der Maus (Lo *et al.* 2002b) und humanen Tumorzellen (Sabatier *et al.* 2005, Fouladi *et al.* 2000, Meltzer *et al.* 1993, Lo *et al.* 2002a) beobachtet. Diese Aberrationsmuster wurden nach Erzeugen eines DNA-Bruches in Telomernähe oder spontanem Telomerverlust in einem spezifischen Chromosom mit in Telomernähe eingeführten Markergenen festgestellt. Zusätzlich kam es auch zur Bildung dizentrischer Chromosomen, die zu BFB-Zyklen führten. Während die in Folge auftretenden unvollständigen Translokationen sowie dizentrischen Chromosomen zu andauernder genomischer Instabilität führten, wurde diese durch den Wiedergewinn funktionaler Telomersequenzen durch Duplikationen an den geschädigten Chromosomen beendet und die chromosomale Integrität der Zelle blieb erhalten. Die Mechanismen und Resultate der durch dysfunktionale Telomere hervorgerufenen Aberrationsmuster, die in humanen Tumorzellen oder embryonalen Stammzellen der Maus parallel auftraten, sind schematisch in Abbildung 4.3 dargestellt.

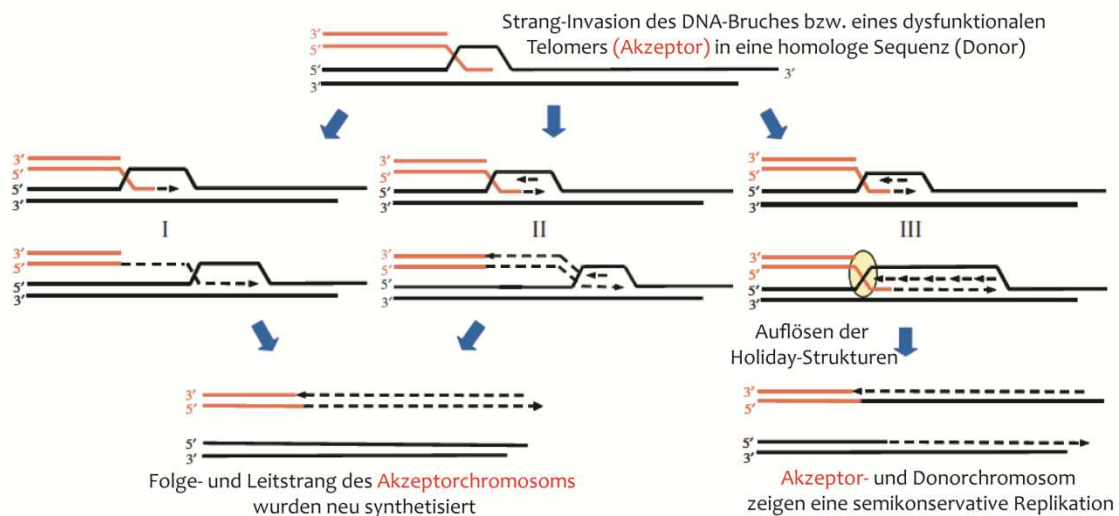


**Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung der möglichen Auswirkungen dysfunktionaler Telomere, die in humanen Tumorzellen (Fouladi *et al.* 2000, Sabatier *et al.* 2005) oder embryonalen Stammzellen der Maus (Lo *et al.* 2002b) beobachtet wurden. (I) An ein dysfunktionales Telomer können durch Telomeraseaktivität neue Telomersequenzen angefügt werden. (II) Dysfunktionale Telomere können über den Rekombinationsmechanismus der „break induced replication“ (BIR, Abbildung 4.4) zu Duplikationen chromosomalen Materials führen. Die Mechanismen (I) und (II) führen durch den Wiedergewinn funktionaler Telomersequenzen zu chromosomaler Stabilität. (III) Nicht-reziproke Translokationen (NRT) ganzer chromosomaler Arme führen zum Wiedergewinn der Telomerintegrität des Akzeptorchromosoms während am Donorchromosom ein offener DNA-Bruch vorliegt. (IV) Die Fusion dysfunktionaler Telomere durch „nicht homologes end-joining“ (NHEJ) führt zu dizentrischen Chromosomen und BFB-Zyklen (Abbildung 4.1). Die Mechanismen (III) und (IV) führen daher zu anhaltender genomischer Instabilität. Modifiziert nach (Hackett *et al.* 2001).



#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

Der Mechanismus, der im Zusammenhang mit einer Duplikation genetischen Materials diskutiert wird, ist die sogenannte „break induced replication“ (BIR) (Bosco und Haber 1998, Li und Heyer 2008, Llorente *et al.* 2008). Die BIR gilt als ein Rekombinationsmechanismus in Hefe- und Tumorzellen, der die Funktionalität von Telomeren erhält (Bosco und Haber 1998, Difilippantonio *et al.* 2002, Sabatier *et al.* 2005). In normalen humanen Zellen konnte dieser allerdings noch nicht gezeigt werden. Der hypothetische Mechanismus der BIR ist schematisch in Abbildung 4.4 dargestellt (Royle *et al.* 2008).



**Abbildung 4.4:** Mechanismus der BIR, modifiziert nach Royle (Royle *et al.* 2008). Dargestellt sind drei Modelle der BIR zwischen nicht-homologen Chromosomen. Das Akzeptor-Chromosom, in der vorliegenden Arbeit dem Chromosom 9 in IMR-90-Zellen entsprechend, ist rot und das Donor-Chromosom schwarz dargestellt. Die Modelle I und II unterscheiden sich nur in der zeitlichen Auflösung der Folgestrang-Synthese, zeigen aber beide einen neu synthetisierten Folge- und Leitstrang des Akzeptorchromosoms ohne Verluste auf dem Donor-Chromosom. In III kommt zur semikonservativen Replikation sowohl des Donor- als auch des Akzeptorchromosoms.

Die Duplikationen in IMR-90-Zellen der vorliegenden Arbeit könnten daher durch BIR der ungeschützten Telomersequenz des q-Arms eines der homologen Chromosomen 9 mit interstitiellen homologen Sequenzen verschiedener Donorchromosomen entstanden sein. Kurze interstitielle Telomersequenzen, die bei diesem Mechanismus als homologe Matrizen dienen könnten, kommen mit einer mittleren Länge etwa 50 bp häufig in humanen Chromosomen vor (Meyne *et al.* 1990, Weber *et al.* 1991, Mondello *et al.* 2000, Ruiz-Herrera *et al.* 2008). Obwohl für homologe Rekombinationsereignisse in Säugerzellen meist Homologien von über 200 bp notwendig sind (Liskay *et al.* 1987), wurden diese in humanen Zellen bereits bei Mikrohomologien von 2-5 bp beobachtet (Hastings *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2009). Eine Anfälligkeit interstitieller Telomersequenzen für Rekombinationsereignisse, die diesen Mechanismus begünstigen würden, wurden in Hamsterzellen und Paramecium gezeigt (Katinka und Bourgain 1992, Bertoni *et al.* 1994, Hastie und Allshire 1989).

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

In NHDF-Zellen eines Experiments (1) kam es, vor der im vorangegangenen Abschnitt 4.1.2.3.2. beschriebenen Monosomien, bereits zu einem deutlich früheren Zeitpunkt der Kultivierung zu einer klonal expandierenden Duplikation eines Fragments von Chromosom 17 (17q21.3-ter) am distalen Ende des p-Arms von Chromosom 4 (Abbildung 3.6). Zu einem noch früheren Zeitpunkt der Kultivierung wurde bereits eine vergleichbare Translokation bzw. wahrscheinliche Duplikation am p-Arm von Chromosom 4 mit einem Fragment von Chromosom 11 festgestellt (Abbildung 3.5). Da für NHDF-Zellen keine Telomer-FISH- bzw. Q-FISH-Analysen durchgeführt wurden, kann nur vermutet werden, dass die beobachtete Duplikation von Chromosom 17q21.3-ter durch dysfunktionale Telomere des p-Arms von Chromosom 4 verursacht wurde. Die Beteiligung verschiedener Chromosomen in den unterschiedlichen Fibroblastenlinien weist auf Abhängigkeiten vom Spender hin und könnten durch spontane Deletionen und Verkürzungen von Telomersequenzen entstanden sein, die bereits in Fibroblasten beobachtet wurden (Baird *et al.* 2003).

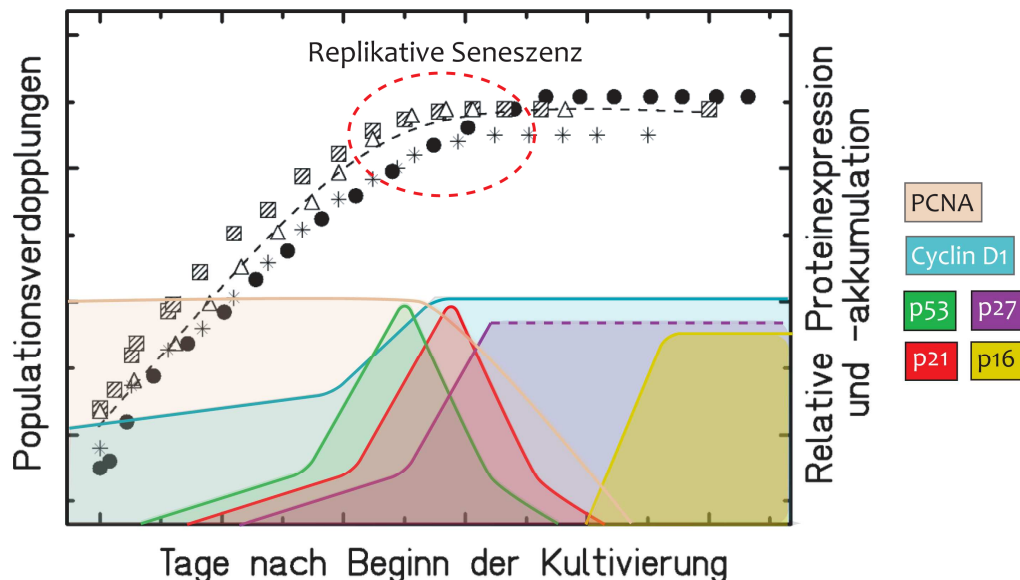
**Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Arten klonal expandierender chromosomaler Aberrationen beobachtet, nämlich Monosomien und Duplikationen. Beide führten zu selektiven Vorteilen und verlängerten Lebensspannen der betroffenen Zellen. Dies zeigte sich für eine Monosomie von Chromosom 6 besonders deutlich, bei der auch genomische Instabilität und eine veränderte Expression des auf Chromosom 6 lokalisierten Gens des CDK-Inhibitors p21 beobachtet wurde. Duplizierte Fragmente verschiedener Donorchromosomen, die an ein verkürztes Telomer eines spezifischen Chromosoms transloziert waren, expandierten im Falle der IMR-90 Zellen unterschiedlich stark. Dadurch wurde die Telomerintegrität wiederhergestellt, was zu den Selektionsvorteilen dieser Zellen beigetragen haben könnte. Da dieses Aberrationsmuster in zwei verschiedenen Fibroblastenlinien auftrat, könnte es sich um einen für normale Fibroblasten bis jetzt nicht beschriebenen Rekombinationsmechanismus zur Erhaltung der Telomerintegrität handeln.**

##### 4.1.3 Langzeitentwicklung der Proteinexpression normaler humaner Fibroblasten

Die fortschreitende Differenzierung und Alterung humaner Fibroblasten geht mit einer charakteristischen Expression zellzyklusinhibierender Proteine einher. In der vorliegenden Arbeit wurde daher überprüft, ob diese in den untersuchten Fibroblastenlinien bereits bekannten Expressionsmustern entspricht und eventuell von der zytogenetischen Entwicklung, speziell klonalen Aberrationen und deren Expansion, beeinflusst wurde. Untersucht wurden der Proliferationsmarker PCNA, das CyclinD1, das Tumorsuppressorprotein p53 und die CDK-Inhibitoren p27, p21 und p16.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

Eine Übersicht über Schlüsselproteine, die an der Regulierung des Übergangs von proliferierenden in seneszente Zellstadien eine wichtige Rolle spielen, ist in Abbildung 4.5 zusammengestellt. Daraus geht hervor, dass das Expressionsniveau von PCNA, einem Kofaktor der Polymerase, in Fibroblasten nach dem Erreichen der Seneszenz deutlich niedriger als in teilungsaktiven Zellen ist (Stein *et al.* 1999, Pendergrass *et al.* 1999, Nishio *et al.* 2001, Han *et al.* 2004). Das in dieser Arbeit untersuchte CyclinD1 ist durch die Aktivierung der CDKs 4 und 6 direkt an einem Übergang von der G1 in die S-Phase des Zellzyklus beteiligt. Durch die Inhibierung dieser CDKs beim Übergang in die Seneszenz und dem daraus resultierenden Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus, kommt es in seneszenten Fibroblasten zu einer Akkumulation dieses Cyclins (Stein *et al.* 1999, d'Adda di Fagagna *et al.* 2003, Dulic *et al.* 1993, Lucibello *et al.* 1993). Ein transienter Anstieg der zellulären Mengen von p53 und p21 beim Übergang in die replikative Seneszenz wurde für Fibroblasten aus diversen Ursprungsgewebe (Haut, Vorhaut, Lunge) verschiedener Spender beschrieben (Stein *et al.* 1999, Wei und Sedivy 1999, Alcorta *et al.* 1996, Noda *et al.* 1994, Chen *et al.* 2004). Erhöhte zelluläre Mengen des CDK-Inhibitors p16 wurden in Lungenfibroblasten dabei gleichzeitig (Wei und Sedivy 1999) oder meist nach einem Rückgang der Akkumulations- und Expressionsniveaus von p53 und p21 (Alcorta *et al.* 1996, Stein *et al.* 1999, Chen *et al.* 2004) beobachtet. Für den CDK-Inhibitor p27, der unabhängig von p53 exprimiert wird (Collado *et al.* 2000), wurde ein zeitgleicher Anstieg mit der p21-Expression beim Erreichen der Seneszenz in Vorhautfibroblasten festgestellt (Wagner *et al.* 2001).



**Abbildung 4.5:** Idealisierte schematische Darstellung der Langzeitentwicklung der PDs und relativen zellulären Mengen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteine in Fibroblasten über die Kultivierungsdauer. Nach dem Erreichen der Seneszenz kommt es zu einem Rückgang der Expressionsniveaus des Replikationskofaktors PCNA. Das CyclinD1 akkumuliert in seneszenten Zellen, die in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind. p53 und p21 akkumulieren transient mit dem Einsetzen der replikativen Seneszenz. Zelluläre p27-Mengen steigen zeitnah zu p21 an, während p16-Mengen meist erst in seneszenten Zellen zunehmen.

In IMR-90- und AG1522D-Zellen der vorliegenden Arbeit wurden vergleichbare zelluläre Expressionsmuster der untersuchten zellzyklusregulierenden Proteine beobachtet, die im Einklang mit den oben aufgeführten Literaturdaten stehen. Trotz der Entwicklung klonaler Aberrationen und Expansion dieser Zellen in IMR-90-Populationen in einem der analysierten Experimente (siehe Abschnitt 3.1.2.3), hatte dies keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten zellzyklusregulierenden Proteine.

Im Gegensatz dazu wich in NHDF-Zellen aller Experimente das Expressionsmuster für die untersuchten Proteine teilweise deutlich von dem anderer Fibroblastenlinien ab. Auch zwischen den einzelnen Experimenten wurden Unterschiede beobachtet, die hauptsächlich auf die Entwicklung klonaler Aberrationen und Expansion dieser Zellen in einem Experiment zurückzuführen sind.

Besonders auffällig war, dass das Tumorsuppressorprotein p53 in Experimenten mit NHDF-Zellen zu allen analysierten Zeitpunkten der Kultivierung nicht detektiert werden konnte, auch nicht nach einer Bestrahlung junger NHDF-Zellen mit einer Dosis von 4 Gy Röntgenstrahlung (Abbildung 3.8d). Nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung akkumuliert p53 in Fibroblasten und transaktiviert den CDK-Inhibitor p21 (El-Deiry *et al.* 1993). Eine erhöhte p21-Expression wurde in NHDF-Zellen nach Röntgenbestrahlung allerdings beobachtet, was auf das Vorhandensein von funktionellem p53 hindeutet. Trotzdem muss einschränkend gesagt werden, dass die Induktion des p21-Gens, unabhängig von p53, möglicherweise auch direkt über die Chk2-Kinase vermittelt werden kann (Rubelj und Pereira-Smith 1994, Tahara *et al.* 1995), wie Untersuchungen in humanen p53-defizienten, immortalen Zellen und humanen Tumorzelllinien gezeigt haben (Aliouat-Denis *et al.* 2005, Chen *et al.* 2005).

Ein weiterer Unterschied ist, dass es zu keinem oder nur sehr schwachen Anstieg der zellulären Mengen der CDK-Inhibitoren p21 und p16 über die Kultivierungsdauer der NHDF-Zellen kam. Dies ist für p21 nicht zwingend dadurch zu erklären, dass p53 nicht detektierbar war, da eine p53-unabhängige p21-Induktion beim Eintritt in die Seneszenz über die Chk2-Kinase erfolgen kann. Dies wurde in normalen humanen Fibroblasten beim Übergang in die replikative Seneszenz durch erodierte und dysfunktionale Telomere beobachtet (Gire 2004, Gire *et al.* 2004). Im Gegensatz zu der schwachen Expression von p21 und p16 wurde für den p53-unabhängigen CDK-Inhibitor p27 ein Anstieg der zellulären Mengen mit dem Erreichen der Seneszenz festgestellt. Demnach könnte in NHDF-Zellen der Eintritt in die Seneszenz durch p27 geregelt werden.

Zu den auffälligsten Unterschieden der Langzeitentwicklung der Proteinexpression zwischen den NHDF-Populationen und anderen Fibroblastenlinien kam es in einem Experiment (1a), in dem Zellen mit einer Monosomie für Chromosom 6 expandierten (siehe Abschnitt 3.1.1.2). Diese Zellen zeigten die längste replikative Lebensspanne aller in der vorliegenden Arbeit

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

durchgeführten Experimente. Im Vergleich zu zwei weiteren Experimenten mit NHDF-Zellen kam es zur deutlichsten Abnahme der Expressionsniveaus der CDK-Inhibitoren p21 und p16 noch vor dem Erreichen der replikativen Seneszenz. Obwohl das Gen für p21 auf Chromosom 6 lokalisiert ist (Knuutila *et al.* 1999) und Monosomie für Chromosom 6 in direktem Zusammenhang zur fehlenden Expression von p21 stehen könnte (siehe Abschnitt 4.1.2.3), wurde noch kein Rückgang der p21-Expression festgestellt, als bereits 98 % der proliferationsaktiven Zellen dieses Experiments eine Monosomie für Chromosom 6 zeigten. Allerdings gehen bei der hier durchgeführten Western-Blot-Analyse sowohl seneszente als auch proliferierende Zellen ein, während für die Chromosomenanalyse nur Metaphasen ausgewertet werden. Die zu diesem Zeitpunkt der Kultivierung noch unveränderte Expression von p21 in der Gesamtpopulation könnte vom Beitrag nicht proliferierender seneszenten Zellen ohne Monosomie für das Chromosom 6 stammen. Durch die klonale Expansion der Zellen, die Monosomie für Chromosom 6 zeigten (siehe Abschnitt 3.1.2.3) und das kontinuierliche Ausdünnen seneszenten Zellen bei fortlaufender Subkultivierung (Goldstein *et al.* 1969, Vracko *et al.* 1983), haben diese Zellen zu sehr späten Zeitpunkten die Population dominiert, was zu den beobachteten verminderten zellulären Mengen von p21 geführt haben kann. Obwohl eine zytogenetische Veränderung, die im Zusammenhang mit der reduzierten p16-Expression steht, nicht festgestellt wurde, könnte diese ebenfalls zu der längeren aktiven Proliferationsphase dieser Zellen beigetragen haben.

**Zusammenfassend wurde für zwei der untersuchten Fibroblastenlinien (AG1522D und IMR-90) eine mit Literaturdaten im Einklang stehende zeitliche Entwicklung der Expression zellzyklusregulierender Proteine beobachtet. Während AG1522D-Zellen keine auffälligen zytogenetischen Veränderungen zeigten, traten in IMR-90-Zellen in einem Experiment deutlich expandierende klonale Aberrationen auf, die allerdings keinen Einfluss auf die Langzeitentwicklung der untersuchten Proteine hatten. Die in allen Experimenten mit NHDF-Zellen niedrigen oder nicht detektierbaren zellulären Mengen zellzyklusregulierender Proteine stehen im Einklang mit der im Vergleich zu AG1522D- und IMR-90-Zellen längeren replikativen Lebensspanne und dem Auftreten genomischer Instabilität.**

##### 4.1.4 Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation in normalen humanen Fibroblasten

Die intrazelluläre Akkumulation von ROS und damit die Störung der Redox-Homöostase wurde bereits früh in Verbindung mit zellulärer Alterung und Seneszenz durch die Schädigung einer Vielzahl zellulärer Makromoleküle, vor allem der DNA gebracht (Droege 2003, Harman 1956). Erhöhte intrazelluläre ROS-Niveaus gelten daher als mitverantwortlich für

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

den Eintritt in die Seneszenz (Ramsey und Sharpless 2006, Saretzki *et al.* 2003, Passos *et al.* 2007, Lu und Finkel 2008) aber auch als Verursacher genomischer Instabilität (Clutton *et al.* 1996, Dayal *et al.* 2009, Limoli *et al.* 2003). Daher wurden intrazelluläre ROS-Mengen in seneszenten und jungen Zellen verglichen, um einen Zusammenhang zwischen zellulärer ROS-Akkumulation und replikativer Seneszenz einerseits und genomischer Instabilität andererseits herstellen zu können.

In allen seneszenten Fibroblastenlinien der vorliegenden Arbeit wurden mindestens 2-fach erhöhte zelluläre ROS-Mengen im Vergleich zu jungen Zellen festgestellt. Mit fortschreiten der Kultivierungsdauer stiegen diese in seneszenten Fibroblasten noch weiter und teilweise bis zu 7-fach an (Abbildung 3.9).

Kurz vor dem Erreichen der replikativen Seneszenz wurde in NHDF-Zellen (Exp.1a) allerdings noch kein Unterschied der zellulären ROS-Mengen im Vergleich zu jungen Zellen festgestellt, obwohl bereits zu früheren Kultivierungszeitpunkten deutliche genomische Instabilität aufgetreten war. Erst nach dem Einstellen der Teilungsaktivität nahmen die ROS-Mengen zu (Abbildung 3.9). Im Gegensatz dazu wurde in AG1522D-Zellen trotz der bereits im Vergleich zu jungen Zellen höheren zellulären ROS-Mengen vor dem Erreichen der Seneszenz (Abbildung 3.23) keine genomische Instabilität festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen damit keinen direkten zeitlichen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und genomischer Instabilität in Fibroblasten, sondern einen Anstieg der zellulären ROS-Mengen mit bzw. nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz.

Hinweise auf einen direkten Beitrag von oxidativem Stress zum Eintritt in die replikative Seneszenz liefern nur Arbeiten, in denen Fibroblasten sublethalen Konzentrationen von oxidativen Agentien, meist Wasserstoff-Peroxid (Chen und Ames 1994, Caldini *et al.* 1998, Dumont *et al.* 2000, Chen *et al.* 1995) oder hyperoxischen Kultivierungsbedingungen, d.h. hohen Sauerstoff-Konzentrationen der umgebenden Atmosphäre ( $> 40\% \text{ O}_2$ , (Klimova *et al.* 2009, Saretzki *et al.* 1998, von Zglinicki *et al.* 1995)) ausgesetzt wurden. Dabei wird diskutiert, dass Zellen aufgrund von oxidativen Schäden, vor allem an der DNA einer, „oxidativen Krise“ unterliegen und daraufhin in die Seneszenz eintreten (Atamna *et al.* 2000). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Zunahme intrazellulärer ROS-Mengen kurz vor oder mit Erreichen der Seneszenz in Fibroblasten kann damit zum Eintritt in die Seneszenz beigetragen haben.

**Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit in allen untersuchten Fibroblastenlinien kurz vor oder nach dem Erreichen der Seneszenz höhere zelluläre ROS-Mengen im Vergleich zu jungen Zellen festgestellt. Es konnte kein zeitlicher Zusammenhang zwischen genomischer Instabilität und den höheren zellulären ROS-Mengen in den *in***

***vitro* gealterten Fibroblasten hergestellt werden, sondern lediglich zur zellulären Alterung und Seneszenz der Zellen.**

#### **4.1.5 Schlussfolgerung: Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten**

Da aus dieser Arbeit vorangegangenen Langzeitstudien mit nicht bestrahlten, normalen humanen Fibroblasten Hinweise auf spontane genomische Instabilität vorliegen, deren Ursachen nicht bekannt sind, wurden drei humane Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90, AG1522D) aus unterschiedlichen Ursprungsgeben (Haut, Lunge, Vorhaut) auf Zusammenhänge zwischen dem Auftreten genomischer Instabilität bzw. Seneszenz und chromosomalen Aberrationen, spezifischen chromosomalen Strukturen (Telomere), der Zellzyklusregulierung sowie physiologischer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hin untersucht. Insgesamt konnte dabei gezeigt werden, dass die diesbezügliche Langzeitentwicklung zwar *per se* von der jeweiligen Fibroblastenlinie abhängt, aber deutliche Unterschiede zwischen Wiederholungsexperimenten der einzelnen Fibroblasten auftreten. Diese stellen sich wie folgt dar:

Genomische Instabilität als Akkumulation instabiler Aberrationen über die Kultivierungsdauer wurde in zwei Fibroblastenlinien (NHDF, IMR-90) festgestellt und in einigen Experimenten dieser Linien wurden ebenfalls klonale chromosomale Aberrationen detektiert. Das Auftreten klonaler Aberrationen und deren Expansion zeigen, dass es in Fibroblastenkulturen zu deutlichen Populationsdynamiken kommen kann. Dabei setzen sich Zellen mit selektiven Vorteilen durch, was zu einer Vereinheitlichung der Populationen im Laufe der Kultivierung führt.

In einem Experiment der NHDF-Zellen kam es zu Monosomien, insbesondere für Chromosom 6, die im Zusammenhang mit einer verlängerten replikativen Lebensspanne der Zellen und sehr deutlicher genomischer Instabilität steht. Dies ist möglicherweise auf eine veränderte Expression des auf Chromosom 6 lokalisierten Gens des CDK-Inhibitors p21 zurückzuführen, der maßgeblich am Eintritt von Fibroblasten in die Seneszenz beteiligt ist. Allerdings gewährleisten redundante Mechanismen, wie in der vorliegenden Arbeit die Expression des CDK-Inhibitors p27 in diesen Zellen, dennoch das irreversible Einstellen der Teilungsaktivität und es wurde keine Immortalisierung der Zellen beobachtet. Für die Transformation von Fibroblasten bedarf es 6-8 unabhängiger Mutationen von Tumorsuppressor- oder Proto-Onkogenen (Fearon und Vogelstein 1990, Rangarajan und Weinberg 2003) und entsprechend selten wird diese in Fibroblasten beobachtet (Morales *et al.* 1999, Shay *et al.* 1993, Shay und Wright 1989).

In IMR-90-Zellen traten in wiederholten Experimenten klonale Aberrationen mit vergleichbaren Aberrationsmustern auf. Diese Aberrationen sind auf verkürzte und dysfunktionale Telomere eines der homologen Chromosomen 9 in diesen Zellen zurückzuführen, die einen in normalen humanen Zellen zum ersten Mal beobachteten Rekombinationsmechanismus aus-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung normaler humaner Fibroblasten

lösten. Dieser führte zu Duplikationen chromosomalen Materials verschiedener Chromosomen mit Telomersequenzen am verkürzten Telomer von Chromosom 9. Dadurch wurde die Telomerintegrität wiederhergestellt und die Zellen erlangten selektive Vorteile. Da dieser Rekombinationsmechanismus wahrscheinlich ebenfalls in einer weiteren nicht-bestrahlten Fibroblastenlinie (NHDF) und Fibroblasten (AG1522D), die für die Bestrahlungsexperimente der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, unter der Beteiligung jeweils anderer Chromosomen (4, 14) auftrat, deutet dies auf einen allgemeinen Mechanismus zur Vermeidung chromosomaler Instabilitäten in Fibroblasten hin.

Oxidativer Stress trat als Zunahme intrazellulärer ROS-Mengen in allen untersuchten Fibroblasten auf, stand aber in keinem zeitlichen Zusammenhang zu genomischer Instabilität sondern lediglich zur zellulären Alterung und Seneszenz der Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen damit, dass Fibroblasten über effiziente Mechanismen verfügen, die einerseits dem Auftreten genomischer Instabilität direkt entgegenwirken oder eine ungebremste Proliferation genomisch Instabiler Zellen verhindern. Dazu zählen der in dieser Arbeit beobachtete Rekombinationsmechanismus zur Erhaltung der Telomerintegrität sowie eine restriktive und redundante Zellzyklusinhibierung.



## 4.2 Zelluläre Veränderungen in bestrahlten Fibroblasten und deren Nachkommen

Eine Bestrahlung von Fibroblasten mit ionisierender Strahlung führt zu einem transienten oder permanenten Arrest in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus (Di Leonardo *et al.* 1994, Gadbois *et al.* 1996). Der Anteil inhibierter Zellen ist dabei abhängig von der Höhe der Dosis sowie der Strahlenqualität (Nasonova *et al.* 2004, Fournier *et al.* 2007, Scholz *et al.* 1994). Der Zellzyklusarrest in der G1-Phase wird durch strahleninduzierte DNA-Schäden hauptsächlich über das Tumorsuppressorprotein p53 vermittelt (Di Leonardo *et al.* 1994). Ein transienter Zellzyklusarrest ermöglicht eine Reparatur von DNA-Schäden. Ein permanenter Arrest oder die Apoptose verhindern die Proliferation zu schwer geschädigter Zellen. In diesem Zusammenhang wurde in Fibroblasten nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung eine Zunahme frühzeitig differenzierter Zellen beobachtet (Herskind und Rodemann 2000, Rodemann *et al.* 1991, Fournier *et al.* 2001, Fournier *et al.* 2007). Bereits vorliegende Ergebnisse für Langzeitkultivierungen von Vorhautfibroblasten, die mit Röntgenstrahlung oder in „broadbeam“-Experimenten mit Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] bestrahlt wurden, zeigen in den ersten Tagen nach der Bestrahlung deutlichere Effekte nach einer Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen bezüglich Zellzyklusarrest, Expression zellzyklusregulierender Proteine, frühzeitiger morphologischer Differenzierung (Fournier *et al.* 2007, Fournier *et al.* 2001, Fournier *et al.* 2004) und chromosomalen Aberrationen (Tenhumberg *et al.* 2007) (RBW = ~3-4).

In den Nachkommen der mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] bestrahlten Zellen konnten mit zunehmender Kultivierungsdauer, d.h. Wochen nach der Bestrahlung, keine Unterschiede mehr bezüglich dieser zellulären Veränderungen im Vergleich zu Kontrollpopulationen festgestellt werden. Mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz wurde eine Zunahme der Anteile von Zellen mit *de novo* gebildeten chromosomalen Aberrationen in den Nachkommen der mit hohen Dosen Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen (8x2 Gy, 16 Gy) im Vergleich zu den Kontrollpopulationen beobachtet, während in den Nachkommen der mit Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] bestrahlten Zellen das Kontrollniveau nicht überschritten wurde (Fournier *et al.* 2007, Zahnreich *et al.* 2010). Diese Ergebnisse deuten auf eine deutlich stärkere Inaktivierung geschädigter Zellen in mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Fibroblasten zu frühen Zeitpunkten nach der Bestrahlung hin. Deren Nachkommen sind zu späten Zeitpunkten der Kultivierung damit nicht mehr in den Populationen vertreten. Damit haben weniger oder nicht geschädigte Zellen einen deutlichen selektiven Vorteil in Langzeitkulturen.

Ein wesentlicher Beitrag zu dieser Entwicklung ist bei konventionellen „broadbeam“-Bestrahlungen am Ionenbeschleuniger auf die stochastische Treffer- und damit Dosisverteilung der Ionen über die bestrahlte Fläche bzw. Zellkerne zurückzuführen. Die Trefferwahrscheinlichkeit hängt dabei von der bestrahlten Fläche und der Teilchenfluenz ab (siehe Ab-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

schnitt 1.1.2). Werden Fibroblasten unter „Broadbeam“-Bedingungen bestrahlt, gibt es daher auch nicht getroffene und weniger geschädigte Zellen. Für diese liegt bei Langzeitkultivierungen ein deutlicher Selektionsvorteil vor, da sie sich gegenüber strahlengeschädigten Zellen schneller vermehren. Diese Tatsache kommt besonders deutlich bei sehr niedrigen Teilchenfluenzen zum tragen. Werden Fibroblasten ( $A_{\text{Zellkern}} = 226 \pm 92 \mu\text{m}^2$  (Winter 2007)) in „broadbeam“-Experimenten z.B. mit einer Fluenz bestrahlt, die zu einer mittleren Trefferwahrscheinlichkeit von einem Kohlenstoff-Ion [9,8 MeV/u; 0,14 Gy;  $5 \times 10^5$  Ionen/cm<sup>2</sup>] pro Fibroblastenzellkern führt (Formel 1.5), werden aufgrund der stochastischen Verteilung 36 % der Zellen nicht getroffen, 37 % erhalten einen und 27 % der Zellen mehr als einen Treffer (Formel 1.6, Abbildung 1.4). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine ursprünglich mit niedrigen Teilchenfluenzen in „broadbeam“-Experimenten bestrahlte Zellpopulation zu späten Analysenzeitpunkten hauptsächlich aus nicht getroffenen Zellen zusammensetzt, ist damit sehr hoch. Daher wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eine gezielte Bestrahlung von Einzelzellen mit einer definierten Anzahl von einem oder fünf Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] an der Mikrosonde der GSI vorgenommen (siehe Abschnitt 2.2.4), die zumindest eine gleiche Trefferzahl und damit Dosis in den bestrahlten Zellen gewährleistet. Eine für Teilchenstrahlung charakteristische, inhomogene mikroskopische Dosisverteilung in den einzelnen Zellen bleibt allerdings bestehen. Dabei ist zu beachten, dass es auch bei einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung trotz der homogenen Dosis- und Schadensverteilung über den bestrahlten Zellkern (siehe Abschnitt 1.1) zur Selektion weniger geschädigter Zellen in Langzeitkulturen bestrahlter Fibroblasten kommt.

Um einen Einfluss der Populationsdynamiken und die Selektion weniger geschädigter Zellen bei den Untersuchungen zur genomischen Stabilität von Nachkommen bestrahlter Fibroblasten einerseits auszuschließen und andererseits näher zu betrachten, wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen wurden die direkten Nachkommen der mit Röntgenstrahlung oder gezielt mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen in Kolonien, die aus einzelnen bestrahlten Zellen hervorgingen, untersucht. Außerdem wurden jeweils etwa 1000 mit genau einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] bestrahlte Zellen aus zwei Bestrahlungspalten als „Massenkultur“ kultiviert. Der Vergleich der Ergebnisse aus beiden experimentellen Ansätzen ermöglicht es, den Einfluss der Populationsdynamiken in einer Massenkultur, die in der Selektion weniger geschädigter Zellen mit Proliferationsvorteilen besteht, von dem Einfluss der Strahlenqualität zu trennen.

Im Folgenden werden zunächst direkt durch die Bestrahlung hervorgerufene zelluläre Effekte, d.h. die Inaktivierung von AG1522D-Zellen nach Bestrahlung und strahleninduzierte chromosomale Schäden betrachtet. Anschließend wird die Langzeitentwicklung der Zellen in Kolonien im Hinblick auf deren genomische Stabilität sowie die Expression zellzyklusregulierender Proteine diskutiert und mit den Ergebnissen für Zellen aus den Massenkulturen ver-

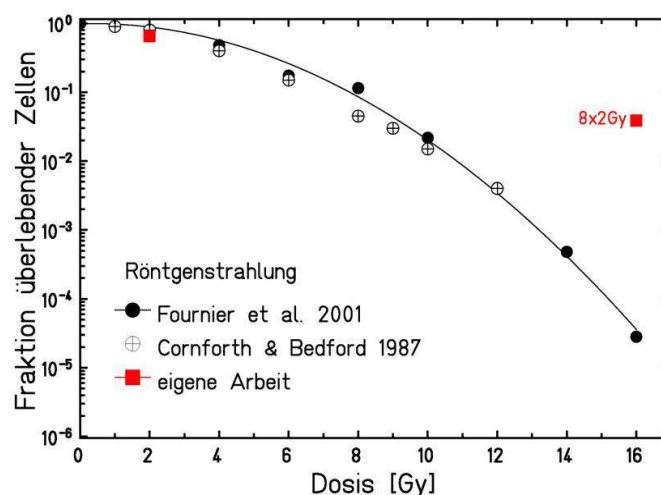
#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

glichen. Abschließend wird die Langzeitentwicklung der strahleninduzierten ROS-Akkumulation in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Fibroblasten diskutiert. Intrazellulär gebildete ROS werden aufgrund ihrer schädigenden Wirkung auf die DNA und vor allem die Telomerstrukturen (Oikawa und Kawanishi 1999, Neeley und Essigmann 2006) sowohl in Verbindung mit Seneszenz (Toussaint *et al.* 2000a) wie auch genomischer Instabilität (Clutton *et al.* 1996, Dayal *et al.* 2008, Limoli *et al.* 2003) gebracht.

##### 4.2.1 Zellüberleben von AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen

Im folgenden Abschnitt wird die strahleninduzierte Inaktivierung von AG1522D-Zellen durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder gezielte Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] diskutiert. Dabei ist zu beachten, dass die bestrahlten Zellen erst 24 Stunden nach Bestrahlung für den Koloniebildungstest ausplattiert wurden und in dieser Erholungsphase eine Reparatur der Strahlenschäden stattfinden konnte („delayed plating“).

In Abbildung 4.6 ist das relative klonogene Überleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung aus der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Daten von Cornforth und Bedford (Cornforth und Bedford 1987) sowie Fournier *et al.* (Fournier *et al.* 2001) gezeigt.



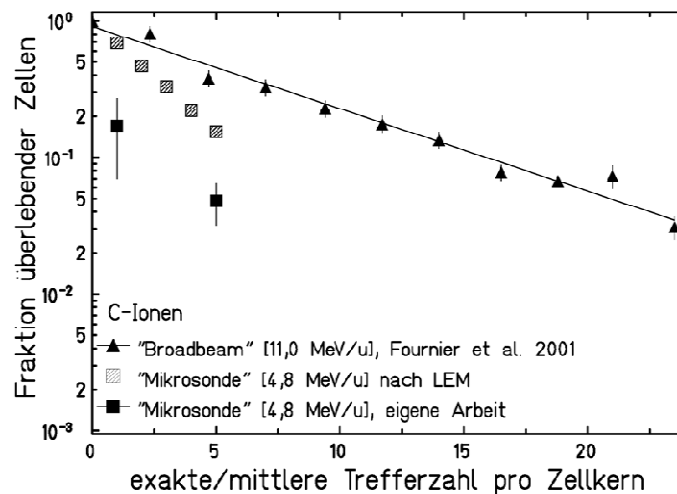
**Abbildung 4.6:** Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit Röntgenstrahlung. Zu Vergleichszwecken sind Überlebensdaten für Vorhautfibroblasten von Cornforth und Bedford (Cornforth und Bedford 1987) und Fournier *et al.* (Fournier *et al.* 2001) gezeigt. Die Zellen wurden in allen Experimenten 24 h nach der Bestrahlung ausgesät.

Das Überleben der AG1522D-Zellen nach einer Bestrahlung mit einmalig 2 Gy Röntgenstrahlung der vorliegenden Arbeit zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund des höheren Überlebens sowie der Relevanz einer fraktionierten Bestrahlung in der Strahlentherapie neben einer einmaligen Applikation einer niedrigeren Dosis (2 Gy) eine fraktionierte Bestrahlung mit einer höheren Gesamtdosis ge-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

wählt (8x2 Gy). Erwartungsgemäß zeigt sich im Vergleich zur Einmaldosis von 16 Gy ein wesentlich höheres Überleben bei fraktionierter Bestrahlung („Fraktionierungseffekt“).

In Abbildung 4.7 ist das relative klonogene Zellüberleben nach einer gezielten Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] an der Mikrosonde im Vergleich zu Daten von Fournier *et al.* (Fournier *et al.* 2001) aus „broadbeam“-Experimenten bei einer Aussaat 24 Stunden nach der Bestrahlung anhand der genauen bzw. mittleren Ionendurchgänge dargestellt. Ebenfalls dargestellt ist das theoretische zelluläre Überleben für einen bis fünf gezielte Durchgänge von Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u], berechnet nach dem „Local Effect Model“ (LEM) nach Scholz (Kramer und Scholz 2006, Scholz 2003, Scholz *et al.* 1997).



**Abbildung 4.7:** Experimentell ermitteltes klonogenes Zellüberleben nach gezielter Bestrahlung von AG1522-Zellen mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] aus der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu experimentellen Überlebensdaten Fournier *et al.* (Fournier *et al.* 2001) aus „broadbeam“-Experimenten mit einer mittleren Trefferzahl an Kohlenstoff-Ionen [11,0 MeV/u]. Ebenfalls dargestellt ist das theoretische zelluläre Überleben für einen bis fünf gezielte Durchgänge von Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u], berechnet anhand des „Local Effect Models“ (LEM) nach Scholz (Kramer und Scholz 2006, Scholz 2003, Scholz *et al.* 1997).

Das relative Zellüberleben nach gezielter Bestrahlung von Einzelzellen mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] der vorliegenden Arbeit war im Vergleich zu den mittleren Teilchendurchgängen der „broadbeam“-Experimente (Fournier *et al.* 2001) deutlich verringert. Dazu trägt zum einen die homogene Trefferverteilung durch die Mikrosonden-Bestrahlungen bei. Zum Anderen unterscheiden sich aus technischen Gründen die Energien der „broadbeam“- und der Mikrosonden-Bestrahlung, wodurch der LET bei Mikrosonden-Bestrahlung höher ist (290 keV/μm versus 150 keV/μm). Somit ist das hier beobachtete niedrigere zelluläre Überleben nach Bestrahlung mit der Mikrosonde zumindest zum Teil auf den höheren LET zurückzuführen. Daher wurde für Vergleichszwecke ebenfalls das theoretische zelluläre Überleben nach einem bis fünf gezielten Durchgängen von Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] anhand des LEM nach Scholz (Kramer und Scholz 2006, Scholz 2003, Scholz *et al.* 1997) berechnet. Das LEM beschreibt die biologische Wirksamkeit von Ionenstrahlen und basiert auf der Grundlage, dass die biologische Wirkung auf eine Zelle von der

räumlichen Verteilung der Dosis innerhalb eines Zellkerns abhängt. Diese Annahme ist dadurch motiviert, dass der lokale Schaden in der Zelle durch  $\delta$ -Elektronen produziert wird, die sowohl durch Photonen wie auch Ionen ausgelöst werden. Daher konnte der durch Ionenstrahlen entstandene lokale Schaden im Zellkern aus korrespondierenden Röntgenexperimenten (Cornforth und Bedford 1987, Fournier *et al.* 2001) abgeleitet werden. Das experimentell ermittelte zelluläre Überleben der gezielten Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] war auch gegenüber dem theoretisch ermittelten Überleben in beiden Fällen deutlich verringert. Worauf dieser Effekt zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle allerdings nicht bestimmt werden.

##### **4.2.2 Direkte Chromosomenschäden in AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion**

Im folgenden Abschnitt richtet sich das Augenmerk auf die Anteile aberranter AG1522D-Zellen und vor allem auf die Komplexität der Aberrationen direkt nach der gezielten Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] pro Zellkern. Dicht-ionisierende Strahlung erzeugt aufgrund der hohen lokalen Energiedeposition im Vergleich zu dünn-ionisierender Strahlung komplexere DNA-Schäden mit einer geringeren Reparierbarkeit (Goodhead *et al.* 1993). Durch die lokale Erzeugung multipler chromosomaler Läsionen und deren Interaktion unterscheidet sich das Spektrum chromosomaler Aberrationen deutlich zwischen verschiedenen Strahlenqualitäten (Anderson *et al.* 2000, Durante *et al.* 2002, Tawn *et al.* 2008). Dabei kommt es bereits bei einer Bestrahlung mit wenigen bis nur einem dicht-ionisierenden Teilchen pro Zellkern zu komplexen chromosomalen Aberrationen (Testard *et al.* 1997, Griffin *et al.* 1995, Anderson *et al.* 2002).

Literaturdaten für einen Vergleich des direkten strahleninduzierten Chromosomenschadens nach Bestrahlung von Fibroblasten mit genau einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] liegen nicht vor. Zum Vergleich können nur Arbeiten herangezogen werden, in denen Fibroblasten oder Lymphozyten in „broadbeam“-Experimenten mit mittleren Trefferzahlen von einem Eisen-Ion [1 GeV/u] (Durante *et al.* 2010) bzw. einem  $\alpha$ -Teilchen [3,3 MeV/u] (Anderson *et al.* 2002) pro Zellkern bestrahlt wurden und damit im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine makroskopisch stochastische Treffer- und Schadensverteilung vorliegt. Die Ergebnisse der mFISH-Analysen des direkten strahleninduzierten Chromosomenschadens im ersten Zellzyklus nach der Bestrahlung aus mFISH-Analysen der vorliegenden Arbeit sowie den Literaturdaten (Durante *et al.* 2010, Anderson *et al.* 2002) sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

**Tabelle 4.2:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus mFISH-Analysen der vorliegenden Arbeit 44 h nach gezielter Bestrahlung von Fibroblasten mit genau einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Ebenfalls dargestellt sind Ergebnisse der mFISH-Analysen frühzeitig kondensierter Interphasechromosomen sowie erster Mitosen aus „broadbeam“-Bestrahlungen mit einer mittleren Trefferzahl von einem Ion pro Zellkern aus einer Arbeit von Durante *et al.* (Durante *et al.* 2010) nach Bestrahlung von Fibroblasten mit Eisen-Ionen [1 GeV/u] und der Arbeit von Anderson *et al.* (Anderson *et al.* 2002) nach Bestrahlung von Lymphozyten mit  $\alpha$ -Teilchen [3,3 MeV/u]. Die Komplexität der Aberrationen ist anhand der beteiligten Chromosomen (C) und Brüche (B) angegeben.

	Eigene Arbeit	Durante [2010]	Anderson [2002]
Zelltyp	Fibroblasten	Fibroblasten	Lymphozyten
Ion [Energie; LET]	C [4,8 MeV/u; 290 keV/ $\mu$ m]	Fe [1 GeV/u; 150 keV/ $\mu$ m]	$\alpha$ [3,3 MeV/u; 121 keV/ $\mu$ m]
Bestrahlungsart	Mikrosonde	„broadbeam“	„broadbeam“
Mittlere Trefferzahl/Zellkern	Gezielt 1 Treffer	1	1
Anteil von Zellen mit			
0	<1	36	36
1	>99	37	37
>1	0	27	27
Treffern pro Zellkern [%]			
Aberrante Zellen [%]	67	26	32
Anteile aberranter Zellen mit einfachen Austauschen [%]	48	75	< 20
Anteile aberranter Zellen mit komplexen Aberrationen [%]	40	13	87
Aberrante getroffene ( $\geq 1$ Ion) Zellen [%]	67	40	50
Anteile aberranter getroffener ( $\geq 1$ Ion) Zellen mit einfachen Austauschen [%]	48	30	< 10
Anteile aberranter getroffener ( $\geq 1$ Ion) Zellen mit komplexen Austauschen [%]	40	5	43
Mittlere Komplexität [C/B]	3/3	-	5/7
Maximale Komplexität [C/B]	4/7	3/3	7/10

Die Anteile aberranter Zellen aller sowie nur der mit mindestens einem oder mehr Ionen getroffenen Zellen der Arbeiten von Durante *et al.* (Durante *et al.* 2010) und Anderson *et al.* (Anderson *et al.* 2002) waren niedriger als in der vorliegenden Arbeit nach gezielter Bestrahlung von Fibroblasten mit genau einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern. Dies ist auf die stochastische Trefferverteilung der „broadbeam“-Experimente zurückzuführen, wodurch bereits 36 % der Zellen nicht von einem Ion getroffen werden. Trotz der exak-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

ten Trefferzahl von einem Kohlenstoff-Ion pro Zellkern wiesen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit etwa 30 % der Zellen keine Aberrationen auf. Dies kann auf eine mehr oder weniger starke Schädigung kritischer Zellkernstrukturen zurückzuführen sein, die eine korrekte oder fehlerhafte Reparatur des Strahlenschadens beeinflussen.

In der Arbeit von Durante *et al.* (Durante *et al.* 2010) wurden im Vergleich zu den mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen deutlich mehr einfache und weniger komplexe chromosomale Austausche mit geringerer Komplexität in den mit einem oder mehr Eisen-Ionen [1 GeV/u] getroffenen Fibroblasten festgestellt. Dieser Unterschied kann auf den abweichenden LET der jeweiligen Ionen-Bestrahlungen (290 keV/μm versus 150 keV/μm) zurückgeführt werden. Eine Zunahme der Komplexität chromosomaler Aberrationen mit steigendem LET bei Bestrahlung von Lymphozyten mit verschiedenen Ionen (Argon, Calcium, Neon, Sauerstoff) wurde bereits gezeigt (Testard *et al.* 1997).

Auch wenn der Anteil aberranter Zellen in den mit einem oder mehr α-Teilchen bestrahlten Lymphozyten niedriger als für eine Bestrahlung von Fibroblasten mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] war, war die Komplexität der Aberrationen trotz des niedrigeren LET dennoch deutlich höher (Anderson *et al.* 2002). Die Autoren schließen daraus, dass in Lymphozyten nach Durchgang eines α-Teilchens vor allem komplexe Aberrationen entstehen. Das dies auf Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für Fibroblasten nicht bestätigt wird, lässt sich auf die unterschiedliche nukleäre Struktur von Lymphozyten und Fibroblasten zurückführen. Durch die flache Geometrie des Zellkerns von Fibroblasten mit einer Höhe und damit einem Bestrahlungsquerschnitt von nur 1-2 μm (Bolzer *et al.* 2005, Kreth *et al.* 2007) werden im Vergleich zur kugelförmigen Geometrie von Lymphozyten mit einem Bestrahlungsquerschnitt von 5-6 μm weniger chromosomale Domänen pro Ionendurchgang getroffen (Ostashevsky 2000), wodurch auch weniger Chromosomen an Chromosomenaustauschen beteiligt sind, deren Komplexität damit geringer ist.

**Es konnte in der vorliegenden Arbeit mittels gezielter Bestrahlung von Fibroblasten mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern gezeigt werden, dass ein Ionen-Durchgang in ca. 30% der Zellen nicht zu Aberrationen führt und dass die Anteile an einfachen und komplexen Aberrationen ähnlich sind. Der trotz eines niedrigeren LET deutlich höhere Anteil komplexer Aberrationen in Lymphozyten nach Bestrahlung mit α-Teilchen, lässt sich zu einem wesentlichen Anteil auf Unterschiede in der Zellkern-Geometrie zurückführen. Dadurch, dass mit der Mikrosonde die Zahl der Ionendurchgänge in allen Zellen gleich ist, zeigten sich in Fibroblasten aber mehr aberrante Zellen und deutlich mehr komplexe Aberrationen, als nach einer „broadbeam“-Bestrahlung von Fibroblasten mit hochenergetischen Eisen-Ionen [1 GeV/u] (Durante**

**et al. 2010), wozu wahrscheinlich aber auch der niedrigere LET der Eisen-Ionen beiträgt.**

#### **4.2.3 Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter AG1522D-Zellen in Kolonien**

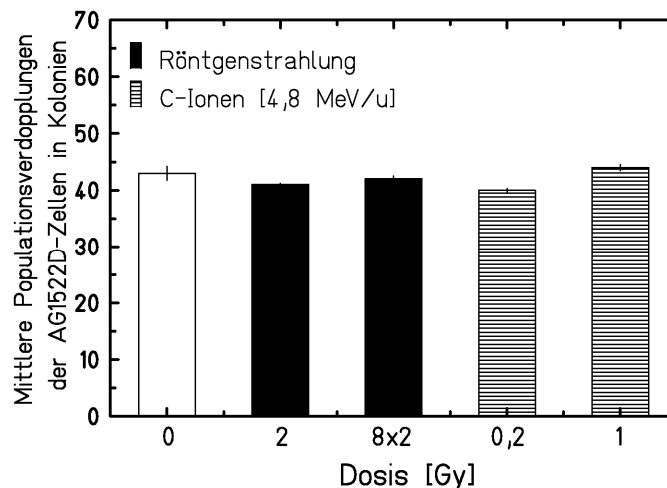
In den folgenden Abschnitten wird die genomische Stabilität der direkten Nachkommen mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen in Kolonien diskutiert. Zwecks Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse der mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten bestrahlten AG1522D-Zellen in Kolonien gemeinsam diskutiert. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Dosen nicht anhand eines vergleichbaren klonogenen Überlebens ausgewählt werden konnten und deshalb zwar „niedrige“ und „hohe“ Dosen verglichen werden, aber kein wirklich quantitativer Vergleich der untersuchten Strahlenqualitäten möglich ist.

##### **4.2.3.1 Zelluläre Alterung schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen in Kolonien**

Eine Zunahme aberranter Zellen und damit genomische Instabilität in Massenkulturen nicht bestrahlter humaner Fibroblasten wurde bereits in der vorliegenden sowie anderen Arbeiten gezeigt (Benn 1976, Dugan und Bedford 2003, Thompson und Holliday 1975, Sherwood *et al.* 1988). Diese steht in direktem Zusammenhang mit der zellulären Alterung der Zellen und tritt meist mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz auf. Für die Untersuchungen der strahleninduzierten genomischen Instabilität in der vorliegenden Arbeit wurde daher eine von drei untersuchten Fibroblastenlinien gewählt, die ein *per se* niedriges chromosomales Schadensniveau über die gesamte Kultivierungsdauer zeigte (AG1522D, siehe Abschnitt 3.1.3.2). Dennoch musste in schein-bestrahlten Zellen der Einfluss der speziellen Kultivierungsbedingungen sorgfältig getestet werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter Zellen das Ende ihrer Lebensspanne in einer ähnlichen Zeit und in vergleichbarem Zustand erreichen. Deshalb wurde das relative zelluläre Alter aller in Kolonien kultivierten AG1522D-Zellen, von denen Chromosomenpräparate vorlagen, anhand der durchlaufenen PDs der Zellen in Kolonien bestimmt und ist in Abbildung 4.8 zusammengefasst.



#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 4.8:** Zusammenfassung der mittleren durchlaufenen PDs schein-bestrahlter sowie mit Röntgenstrahlung (2/8x2) oder gezielt mit Kohlenstoff-Ionen [0,2/1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen in Kolonien, die für Chromosomenanalysen der vorliegenden Arbeit herangezogen wurden. (N = Anzahl der Experimente; n = Anzahl der Kolonien).

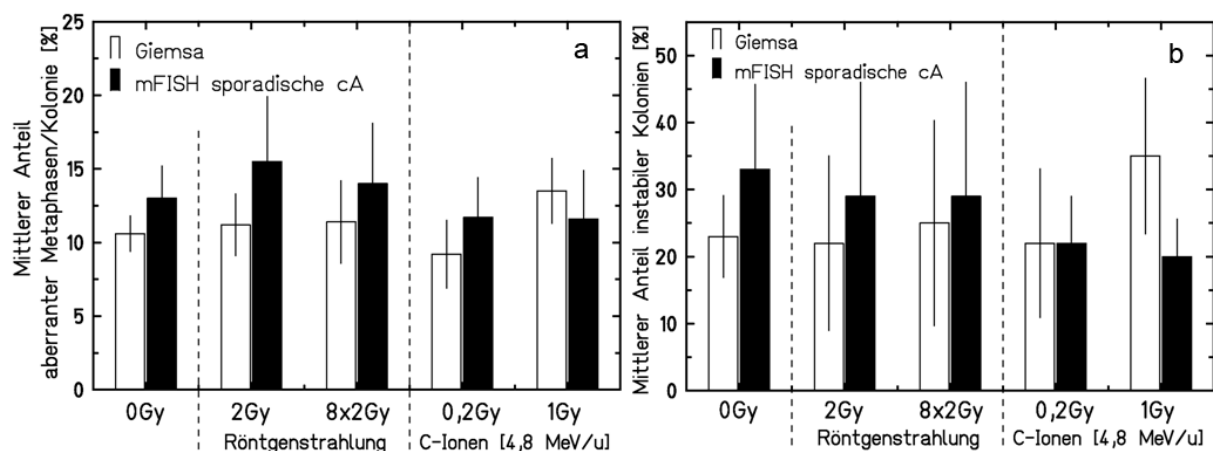
Bezüglich der durchlaufenen PDs und damit des relativen zellulären Alters zum Analysenzeitpunkt konnte kein Unterschied zwischen schein-bestrahlten und mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen in Kolonien festgestellt werden. Die Anzahl durchlaufener PDs aller AG1522D-Zellen in Kolonien zum Analysenzeitpunkt lag ebenfalls im Bereich anderen Experimente mit AG1522-Zellen (PD 45, siehe Abschnitt 3.1.3.1; PD 44 in (Zahnreich *et al.* 2010)). Damit durchliefen isolierte AG1522D-Zellen in Kolonien unabhängig von einer vorherigen Strahlenexposition bis zum Analysenzeitpunkt mit Massenkulturen vergleichbare maximale PDs und standen kurz vor dem Erreichen der replikativen Seneszenz.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass für spätere Chromosomenanalysen gezielt Kolonien mit sehr proliferationsaktiven AG1522D-Zellen in frühen mitotischen Differenzierungsstadien (MFI/II) isoliert wurden, um für die Analysen ausreichende Zellzahlen zu erreichen. Die hier durchgeführte Bestimmung der durchlaufenen PDs reflektiert damit nicht die Entwicklung aller Nachkommen bestrahlter Zellen. Das zeigt sich darin, dass in Massenkulturen von bestrahlten AG1522-Zellen im Vergleich zu Kontrollpopulationen bereits ein zeitlich früheres Einsetzen der replikativen Seneszenz mit weniger durchlaufenen PDs beobachtet wurde (Zahnreich *et al.* 2010, Fournier *et al.* 2007).

**Zusammengefasst wurde damit in allen für Chromosomenanalysen herangezogenen Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen ein vergleichbares zelluläres Alter beobachtet, dass dem Zeitpunkt der replikativen Seneszenz in nicht bestrahlten Massenkulturen entspricht.**

#### 4.2.3.2 Zytogenetische Langzeitentwicklung schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen in Kolonien

Die Langzeitentwicklung von Zellen wird entscheidend von der Stabilität des Genoms geprägt. Da genomische Instabilität unter anderem als eine Zunahme instabiler chromosomaler Aberrationen auftritt, sind in Abbildung 4.9 für den Vergleich schein-bestrahlter und mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen die mittleren Anteile von Metaphasen pro Kolonie aufgeführt, die instabile Aberrationen zeigten. Hierzu wurden die Daten der Giemsa-Analysen mit dem Anteil sporadischer Aberrationen aus mFISH-Analysen zusammengefasst (siehe Abschnitt 3.2).



**Abbildung 4.9:** (a) Mittlere Anteile abnormer Metaphasen pro Kolonie der Nachkommen schein-bestrahlter sowie mit Röntgenstrahlung (2/8x2 Gy) oder Kohlenstoff-Ionen [0,2/1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen mit instabilen Aberrationen aus Giemsa-Analysen sowie sporadischen chromosomalen Aberrationen (cA) aus mFISH-Analysen der vorliegenden Arbeit. (b) Mittlere Anteile instabiler Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter sowie mit Röntgenstrahlung (2/8x2 Gy) oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] (0,2/1 Gy) bestrahlten AG1522D-Zellen. Als Schwellenwert wurde der mittlere Anteil abnormer Metaphasen der Kolonien schein-bestrahlter AG1522D-Zellen zuzüglich eines Standardfehlers festgelegt. Dieser lag für Giemsa- und mFISH-Analysen bei 13 % bzw. 15 % abnormen Metaphasen pro Kolonie. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Die mittleren Werte der Anteile abnormer Zellen pro Kolonie mit instabilen Aberrationen aus Giemsa- und sporadischen Aberrationen aus mFISH-Analysen waren vergleichbar. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen feststellen. Die mittleren Anteile abnormer AG1522D-Zellen pro Kolonie lagen außerdem im Bereich der entsprechenden Werte für Massenkulturen ( $9 \% \pm 3$  (Giemsa), Abbildung 3.21;  $12 \% \pm 3$  (mFISH), Abbildung 3.38).

Als ein weiteres Kriterium zur Beurteilung der genomischen Stabilität bestrahlter AG1522D-Zellen in Kolonien werden die Anteile sogenannter „instabiler Kolonien“ der Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter Kolonien aus Giemsa- und mFISH-Analysen in Abbildung 4.9b miteinander verglichen. Kolonien werden dabei als instabil bezeichnet, wenn deren mittlerer Anteil abnormer Metaphasen pro Kolonie über dem der schein-bestrahlten AG1522D-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

Zellen zuzüglich einer Standardabweichung lag. Für Kontrollen wurden in Giemsa- bzw. mFISH-Analysen 23 % ( $\pm 6$ ) bzw. 33 % ( $\pm 13$ ) instabile Kolonien beobachtet. Es kam nur in den Nachkommen der mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen zu einem höheren Anteil instabiler Kolonien in Giemsa-Analysen (35 %  $\pm 12$ ), während die Ergebnisse der mFISH-Analysen (20 %  $\pm 6$ ) im Bereich der Kontrolle lagen.

Es hat sich demnach gezeigt, dass für beide Strahlenqualitäten der Anteil instabiler Kolonien in den Nachkommen der AG1522D-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht ist. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Daten aus Massenkulturen. Nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wurden dabei deutliche Auswirkungen auf die Integrität des Genoms der Nachkommen ursprünglich bestrahlter humaner Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet (Fournier *et al.* 2007, Zahnreich *et al.* 2010, Kadhim *et al.* 1998). Die in diesen Arbeiten festgestellte genomische Instabilität äußerte sich vor allem im Auftreten von Aberrationen des Chromatidtyps sowie Telomerfusionen. In der Arbeit von Kadhim *et al.* (Kadhim *et al.* 1998) trat diese allerdings nur in einer von zwei untersuchten Fibroblastenlinien auf. Dieser Unterschied wird auf eine Abhängigkeit des Auftretens strahleninduzierter genomischer Instabilität von genetischen Faktoren und damit einer spenderabhängigen Prädisposition zurückgeführt (Little 1998, Kadhim 2003). In den Nachkommen von Hautfibroblasten beobachteten Martins *et al.* (Martins *et al.* 1993) ebenfalls ein Auftreten instabiler Aberrationen, hauptsächlich in Form von Telomerfusionen, nach Bestrahlung mit Neon-, Argon- oder Blei-Ionen.

Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind die Daten von Dugan und Bedford (Dugan und Bedford 2003), die in den Nachkommen mit  $\gamma$ -Strahlung oder hochenergetischen Eisen-Ionen [1 GeV/u] bestrahlten Vorhautfibroblasten keine höheren Aberrationsraten als für Kontrollen festgestellt haben, während eine allgemeine altersabhängige Zunahme von Aberrationen mit dem Erreichen der Seneszenz beobachtet wurde. Damit lassen kontroverse Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten und limitierende Daten einzelner Studien keine verallgemeinernden Schlüsse bezüglich des Auftretens der strahleninduzierten genomischen Instabilität zu.

##### 4.2.3.3 Klonale chromosomale Aberrationen in Kolonien bestrahlter AG1522D-Zellen

Neben den zuvor diskutierten instabilen und sporadischen Aberrationen, die meist als ein Indikator der genomischen Instabilität herangezogen werden, wurden mittels der mFISH-Methode aber ebenfalls klonale Aberrationen in den Kolonien schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen detektiert. Bezüglich klonaler Aberrationen muss in den Nachkommen bestrahlter AG1522D-Zellen in Kolonien zwischen Aberrationen, die entweder in allen oder nur einigen Metaphasen einer Kolonie vorhanden waren, unterschieden werden.

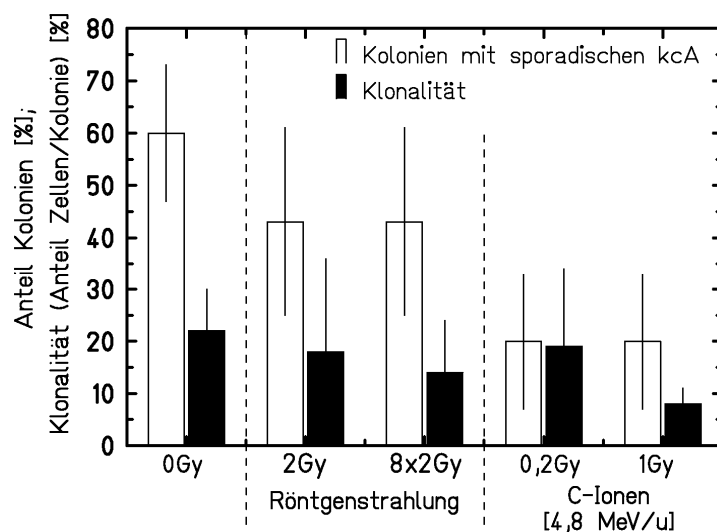
#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

Zeigen alle analysierten Metaphasen einer Kolonie der Nachkommen bestrahlter Zellen die gleiche klonale Aberration, kann davon ausgegangen werden, dass diese durch Bestrahlung in der Ursprungszelle der Kolonie erzeugt und stabil an deren Nachkommen weitergegeben wurde. Waren die klonalen Aberrationen allerdings nicht in allen analysierten Metaphasen einer Kolonie detektierbar und damit auch noch nicht in deren Ursprungszelle vorhanden, sind diese spontan in einer Zelle während des Wachstums der Kolonie entstanden.

Die Bildung von Subpopulationen mit klonalen Aberrationen und damit die karyotypische Diversifikation von Zellpopulationen gilt als ein Charakteristikum genomischer Instabilität, da die Entstehung transmissibler Aberrationen und deren klonale Expansion als ein entscheidender Schritt der Tumorentstehung diskutiert wird (Mitelman *et al.* 2007, Talmadge 2007, Gao *et al.* 2007); sie ist daher in der vorliegenden Arbeit ebenfalls von Interesse. Im folgenden Abschnitt werden zunächst spontan entstandene klonale Aberrationen in Kolonien schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen diskutiert. Strahleninduzierte klonale Aberrationen und deren Vererbbarkeit an die Nachkommen der bestrahlten AG1522D in Kolonien werden später betrachtet.

##### Spontane klonale chromosomale Aberrationen in Kolonien mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen bestrahlten AG1522D-Zellen

In Abbildung 4.10 sind die mittleren Anteile aller Kolonien schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen dargestellt, in denen spontan entstandene klonale Aberrationen detektiert wurden. Zusätzlich gezeigt sind die mittleren Expansionsraten der Zellen mit klonalen Aberrationen in den betroffenen Kolonien, als sogenannte „Klonalität“ bezeichnet.



**Abbildung 4.10:** Anteile von Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter und mit Röntgenstrahlung (2/8x2 Gy) oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] (0,2/1 Gy) bestrahlten AG1522D-Zellen mit sporadisch entstandenen klonalen Aberrationen. Ebenfalls dargestellt sind die mittleren Expansionsraten der Zellen mit sporadischen klonalen Aberrationen pro Kolonie („Klonalität“). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

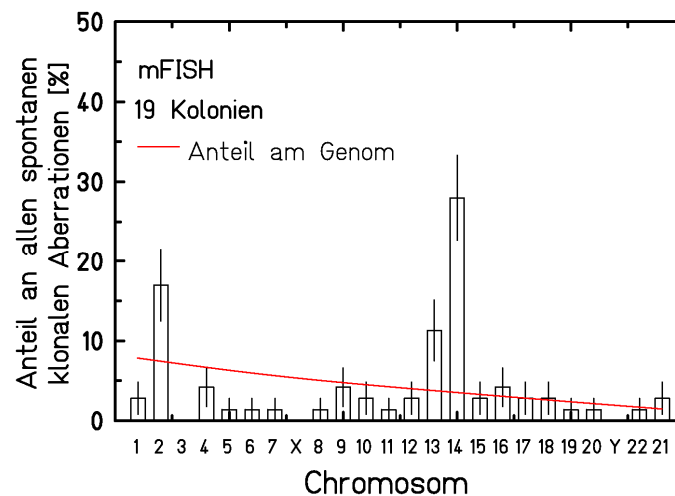
Es kam bereits in 60 % der Kolonien schein-bestrahlter AG5122D-Zellen spontan zu klonalen Aberrationen, die im Mittel auf 22 % ( $\pm 8$ ) der Metaphasen pro Kolonie expandierten („Klonalität“). In den Nachkommen aller bestrahlten AG1522D-Zellen waren die Anteile von Kolonien mit spontanen klonalen chromosomalen Aberrationen niedriger und die Klonalität vergleichbar mit den Nachkommen der schein-bestrahlten Zellen, bzw. in Kolonien der mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen deutlich niedriger. Dies weist auf eine Selektion genomisch stabilerer Zellen in den Nachkommen der bestrahlten AG1522D-Zellen im Vergleich zu schein-bestrahlten Zellen hin. Diese Selektion könnte das Ergebnis einer effektiveren Entfernung von Zellen aus der proliferierenden Gemeinschaft sein, die *a priori* eine Prädisposition für chromosomale Instabilitäten mitbringen. Auffallend ist dabei, dass die Erniedrigung der Anteile von Kolonien mit spontanen klonalen Aberrationen nur abhängig von der Strahlenqualität und nicht von der Höhe der applizierten Dosis war und damit auch nicht mit dem relativen zellulären Überleben nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] korreliert (siehe Abschnitt 3.2.1).

Der relativ hohe Anteil von Kolonien schein-bestrahlter AG1522D-Zellen mit sporadischen klonalen Aberrationen (60 %) steht deutlich im Gegensatz zur zytogenetischen Entwicklung nicht bestrahlter AG1522D-Zellen in Massenkulturen der vorliegenden Arbeit, in denen keine klonale Expansion transmissibler Aberrationen festgestellt wurde (siehe Abschnitt 3.1.3.3 und 3.3.6.2). Dennoch liegen Ergebnisse für ein Experiment mit AG1522D-Zellen vor, in dem Zellen mit einer klonalen Aberration auf über 80 % der Population in einer Massenkultur expandierten (Fournier *et al.*, unveröffentlicht), was mit einer verlängerten replikativen Lebensspanne und genomischer Instabilität in diesen Zellen einherging. In der vorliegenden Arbeit wurden in allen Zellen schein-bestrahlter oder bestrahlter AG1522D-Zellen mit spontan entstandenen klonalen Aberrationen allerdings keine verlängerte replikative Lebensspanne oder eine deutlichere Zunahme instabiler Aberrationen im Vergleich zu Zellen ohne klonale Aberrationen beobachtet. Dennoch zeigt sich auch innerhalb der Kolonien ein Selektionsvorteil für Zellen mit klonalen Aberrationen aufgrund der relativ hohen Expansionsraten gegenüber Zellen mit normalem Karyotyp.

Bezüglich der in Kolonien schein-bestrahlter und bestrahlter AG5122D-Zellen beobachteten spontanen klonalen Aberrationen war besonders auffällig, dass einzelne Chromosomen überproportional oft an deren Entstehung sowie an der Bildung mehrerer klonaler Subpopulationen pro Kolonie beteiligt waren (Tabelle 3.2.3/4/5/6). Daher ist in Abbildung 4.11 die Beteiligung aller Chromosomen an spontanen klonalen Aberrationen in den Kolonien schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen zusammengefasst. Bei sporadischen chromosomalen Aberrationen sollten die Wahrscheinlichkeit eines DNA-Bruches und damit die mögliche Beteiligung eines Chromosoms an einer Aberration von seinem relativen Anteil am Gesamtgenom abhängen. Daher ist dieser, anhand der physikalischen Chromosomenlänge

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

nach Morton (Morton 1991), ebenfalls in Abbildung 4.11 dargestellt. Weitere Faktoren wie die relative Chromatindichte, fragile chromosomale Territorien oder Telomere können allerdings kritische Strukturen darstellen und die Stabilität einzelner Chromosomen beeinflussen.



**Abbildung 4.11:** Beteiligung aller Chromosomen an spontan entstandenen klonalen Aberrationen in Kolonien aller schein-bestrahlten und bestrahlten AG1522D-Zellen. Der Anteil der Chromosomen am Genom, ermittelt anhand der physikalischen Chromosomenlänge nach Morton (Morton 1991), ist angegeben. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Eine überproportional häufige und damit vom relativen Anteil am Genom deutlich abweichende Beteiligung an allen sporadischen klonalen chromosomalen Aberrationen wurde für die Chromosomen 2, 13 und 14 festgestellt. Chromosom 14 war dabei am häufigsten, und zwar in 28 % der Fälle beteiligt. Des Weiteren wurde ein vergleichbares Aberrationsmuster beobachtet: alle sporadischen klonalen Aberrationen waren Translokationen und immer am distalen Ende des p-Arms und damit wahrscheinlich an der Telomerregion von Chromosom 14 lokalisiert. Bei Translokation größerer azentrischer chromosomaler Fragmente an den p-Arm von Chromosom 14 liegen Hinweise vor, dass es sich um Duplikationen des translozierten chromosomalen Materials handelt (Abbildung 3.26b). Duplikationen und deren klonale Expansion wurden in der vorliegenden Arbeit unabhängig von Bestrahlung bereits in anderen Fibroblastenlinien (IMR-90, NHDF) an jeweils spezifischen Chromosomen (9, 4) unter Beteiligung dysfunktionaler Telomere beobachtet (siehe Abschnitt 4.1.2.3.2). In den Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen wurden allerdings keine mBAND oder Telomer-FISH-Analysen, die Duplikationen chromosomalen Materials oder eine Beteiligung dysfunktionaler Telomersequenzen an den Aberrationen zeigen könnten, durchgeführt. Daher kann an dieser Stelle nur vermutet werden, dass die Bildung klonaler Subpopulationen in den Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen auf eine spenderabhängige Prädisposition für Instabilitäten einzelner Chromosomen (2, 13, 14), der für die vorliegende Arbeit verwendeten AG1522D-Zellen zurückzuführen ist. Die Instabilität eines Chromosoms und klonale Expansion der daraus entstandenen transmissiblen Aberrationen wurden ebenfalls von Martins *et al.* (Martins *et al.* 1993, Martins *et al.* 1994) in den

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

Nachkommen ursprünglich mit verschiedenen Ionen (Neon, Argon, Blei) bestrahlten Hautfibroblasten für die Telomerregion von Chromosom 13 festgestellt.

**Zusammenfassend wurde damit genomische Instabilität in den Nachkommen scheinbestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen in Kolonien durch die spontane Bildung klonaler Subpopulationen unter überproportional häufiger Beteiligung einzelner Chromosomen beobachtet. Diese war in den Kolonien der Nachkommen bestrahlter, insbesondere mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten Zellen allerdings geringer als in scheinbestrahlten Zellen. Dies weist auf eine effiziente Inaktivierung von Zellen mit Prädispositionen für eine bereits in scheinbestrahlten AG1522D-Zellen auftretende genomische Instabilität durch die Bestrahlung hin.**

#### **Strahleninduzierte klonale chromosomale Aberrationen in Kolonien mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen bestrahlten AG1522D-Zellen**

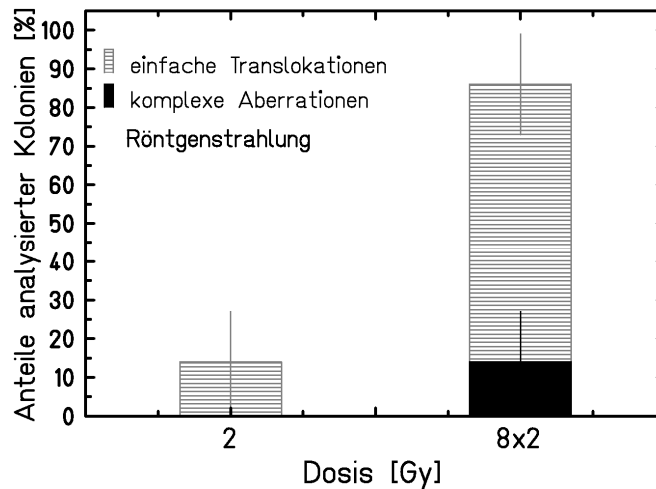
Im Gegensatz zu sporadischen Aberrationen wurden strahleninduzierte klonale Aberrationen in allen Metaphasen einer Kolonie der Nachkommen bestrahlter AG1522D-Zellen detektiert. Dabei ist von Interesse, ob es durch die daraus resultierenden genetischen Veränderungen zu einer Selektion dieser Zellen kam und deren genomische Stabilität dadurch beeinflusst wurde. Dies wurde bereits in den Nachkommen bestrahlter Fibroblasten, die in Massenkulturen einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt sind, gezeigt (Fournier *et al.* unveröffentlicht, (Zahnreich 2007)).

Da die verwendeten Dosen und auch die Aberrationsspektren für Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] nicht direkt vergleichbar sind, werden die beiden Strahlenqualitäten im Folgenden zunächst getrennt diskutiert.

#### **Strahleninduzierte klonale Aberrationen in Kolonien mit Röntgenstrahlung bestrahlten AG1522D-Zellen**

Die Anteile der Kolonien mit strahleninduzierten klonalen Aberrationen der Nachkommen mit Röntgenstrahlung bestrahlten AG1522D-Zellen sind in Abbildung 4.12 zusammengefasst. Alle strahleninduzierten klonalen Aberrationen waren einfache Translokationen oder komplexe Aberrationen.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 4.12:** Anteile von jeweils 7 Kolonien mit strahleninduzierten klonalen Aberrationen der Nachkommen mit 2 Gy oder 8x2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten AG1522D-Zellen aus mFISH-Analysen. Alle strahleninduzierten klonalen Aberrationen waren einfache Translokationen oder komplexe Aberrationen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In Kolonien der Nachkommen der mit 2 Gy oder 8x2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen kam es mit steigender Dosis zu einer Zunahme der Anteile von Kolonien mit strahleninduzierten klonalen Aberrationen. In den Nachkommen der mit 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten AG1522D-Zellen in Kolonien trat eine einfache strahleninduzierte Translokation pro Zelle auf. In den Nachkommen der mit 8 Fraktionen à 2 Gy bestrahlten AG1522D-Zellen betrug die mittlere Aberrationsrate 1,6 pro Zelle und zusätzlich zu einfachen Translokationen wurde eine komplexe Aberration detektiert. Da aus der vorliegenden Arbeit sowie der Literatur keine mFISH-Daten bezüglich direkter Chromosomenschäden nach Bestrahlung mit den hier applizierten Dosen Röntgenstrahlung vorliegen, kann an dieser Stelle nicht bestimmt werden, ob diese stabil an die Nachkommen vererbt wurden und damit als strahleninduzierte klonale Aberrationen in den Kolonien auftraten. Darauf weisen aber die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hin, da vor allem in den Nachkommen der mit 8x2 Gy bestrahlten AG1522D-Zellen in 90 % der Kolonien strahleninduzierte klonale Aberrationen detektiert wurden. Diese hatten damit keinen direkten Einfluss auf die Selektion, ein verändertes Proliferationsverhalten (siehe Abschnitt 4.2.3.1) oder die genomische Stabilität (siehe Abschnitt 4.2.3.2) der direkten Nachkommen bestrahlter Zellen in den Kolonien. Diese Annahme wird durch Daten von mit Röntgenstrahlung bestrahlten Jurkat-Zellen unterstützt (Duran *et al.* 2009). Beim Vergleich mit vorliegenden mFISH-Daten bezüglich einer Langzeitkultivierung von AG1522-Zellen in Massenkulturen, die mit denselben Dosen Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, fällt zumindest für die höhere Dosis (8x2 Gy) auf, dass nach Bestrahlung nur annähernd 30 % der Nachkommen transmissible Aberrationen zeigten, die teilweise schwach klonal expandierten (maximal 5 % der Population (Zahnreich 2007)). Im Gegensatz dazu zeigen annähernd 90 % der Kolonien, in denen die Zellen einem relativ geringen Selektionsdruck ausgesetzt sind, strahleninduzierte klonale Aberrationen (Abbildung 4.11). Dies zeigt

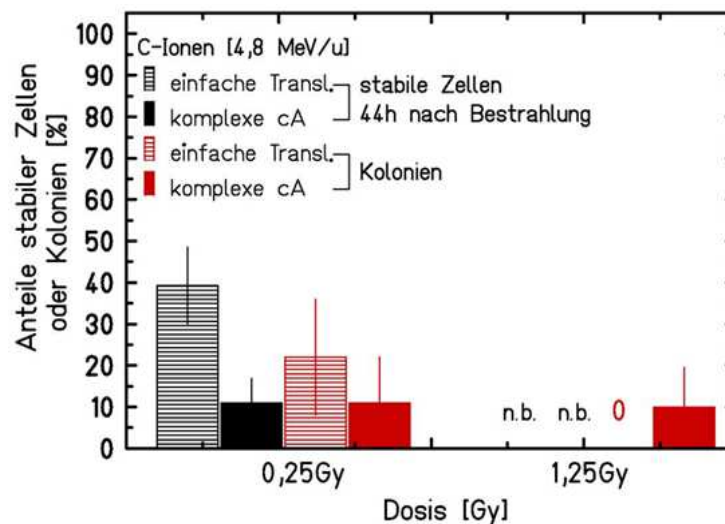


den immensen Einfluss des Selektionsdrucks in Massenkulturen, der zur Auslese nicht geschädigter Zellen führt.

##### **Strahleninduzierter klonale chromosomale Aberrationen in Kolonien mit Kohlenstoff-Ionen bestrahlten AG1522D-Zellen**

Für die Diskussion der Vererbbarkeit strahleninduzierter Aberrationen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] können die Analysen des strahleninduzierten Initialschadens 44 h nach Bestrahlung (siehe Abschnitt 3.2.4.1 und 4.2.3.2) herangezogen und direkt mit den in Kolonien detektierten strahleninduzierten Aberrationen verglichen werden. Bezüglich einer Vererbbarkeit sind direkt nach Bestrahlung nur Zellen mit Aberrationen von Interesse, die stabil an die Nachkommen weitergegeben werden können. Diese Zellen sowie Zellen ohne Aberrationen werden allgemein als „stabil“ bezeichnet. Nicht berücksichtigt werden Zellen mit nicht-transmissiblen Aberrationen wie dizentrischen Chromosomen, zentrischen Ringen oder azentrischen Fragmenten, die nicht stabil an die Nachkommen weitergegeben werden, da sie zu einer Inaktivierung der Zellen führen (Al-Achkar *et al.* 1988, Carrano und Heddle 1973, Bauchinger *et al.* 1986, Braselmann *et al.* 1986). In Abbildung 4.13 sind die Anteile „stabiler Zellen“ mit strahleninduzierten transmissiblen Aberrationen aus Chromosomenanalysen 44 h nach der Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] (siehe Abschnitt 3.2.4.1) sowie die Anteile von Kolonien mit strahleninduzierten Aberrationen der Nachkommen mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen (siehe Abschnitt 3.2.4.2 und 4.2.3.4) dargestellt. Alle strahleninduzierten transmissiblen Aberrationen waren einfache Translokationen oder komplexe Aberrationen.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten



**Abbildung 4.13:** Anteile aller „stabilen Zellen“, die 44 h nach der Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] strahleninduzierte transmissible chromosomale Aberrationen (cA) zeigten und Anteile aller Kolonien der Nachkommen von AG1522D-Zellen, die mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlt wurden und strahleninduzierte klonale Aberrationen in allen Metaphasen zeigten. Stabile Zellen haben keine oder nur transmissible Aberrationen, die in allen Fällen entweder einfache Translokationen oder komplexe Aberrationen waren. Für eine Bestrahlung mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] wurden Chromosomens Schäden direkt nach der Bestrahlung nicht bestimmt (n.b.). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Nach der Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern wurden 44 h nach Bestrahlung etwas mehr stabile Zellen (50 %) mit rein transmissiblen Aberrationen detektiert, als später Anteile von Kolonien (30 %), d.h. deren direkten Nachkommen mit strahleninduzierten klonalen Aberrationen. Es kam dabei zu einer Reduktion der Anteile stabiler Zellen mit einfachen Translokationen (39 %) im Vergleich zu Kolonien mit strahleninduzierten einfachen Translokationen (22 %). Im Gegensatz dazu waren die jeweiligen Anteile stabiler Zellen (11 %) und Kolonien (10 %) mit transmissiblen komplexen Aberrationen sowie deren Komplexität (C/A/B: 3/3/3 bzw. 2/2/3) vergleichbar. Dies ist auffallend, da komplexe Aberrationen mehr genetische Veränderung für die betroffene Zelle bedeuten, die möglicherweise deren Langzeitentwicklung negativ beeinflussen könnten. In den Kolonien der ursprünglich mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen wurden im Vergleich zur Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] in weniger Kolonien (10 %) strahleninduzierte klonale Aberrationen festgestellt, die aber alle komplex waren und eine deutlich höhere Komplexität (C/A/B: 4/5/6) zeigten. Dies entspricht einerseits Beobachtungen, dass die Komplexität chromosomaler Aberrationen in Abhängigkeit der Dosis und damit Teilchenfluenz zunimmt und sich dadurch das Gleichgewicht von einfachen zu komplexen Aberrationen zugunsten komplexer verschiebt (Loucas *et al.* 2004, Durante *et al.* 2010, Wu *et al.* 2003). Andererseits kommt es bei Bestrahlung mit dicht-ionisierender Strahlung im Gegensatz zur Bestrahlung mit dünn-ionisierender Strahlung mit steigender Dosis allgemein zu einer Abnahme aberranter Zellen durch die Entstehung von mehr instabilen und damit lethalen Aberrationen (Nasonova *et al.* 2004), was einen deutlichen selektiven Vorteil für weniger

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

geschädigte Zellen mit sich bringt. In diesem Zusammenhang wurde in einer Arbeit von Tenhumberg *et al.* (Tenhumberg *et al.* 2007) anhand von Giemsa-Analysen in AG1522-Zellen nach „broadbeam“-Bestrahlung mit im Mittel vier Kohlenstoff-Ionen [11,0 MeV/u] pro Zellkern bis zu 70 % aberrante Metaphasen mit nicht transmissiblen Aberrationen in AG1522-Zellen, die sich in der 1. Mitose nach Bestrahlung befanden, festgestellt. Dies weist auf eine deutlich stärkere Inaktivierung der gezielt mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen der vorliegenden Arbeit durch instabile und wahrscheinlich komplexe Aberrationen und eine Begünstigung der Selektion weniger geschädigter Zellen hin. Dazu passt, dass in 90 % der Kolonien nach Bestrahlung mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] keine strahleninduzierten Aberrationen festgestellt wurden.

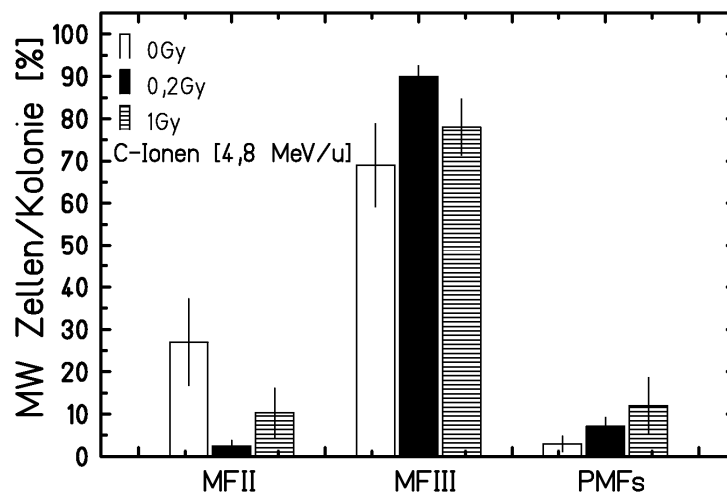
**Zusammenfassend wurde in den Nachkommen der mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen eine Vererbbarkeit und damit Persistenz transmissibler strahleninduzierter Aberrationen beobachtet, die als klonale Aberrationen in allen Metaphasen der betroffenen Kolonien auftraten. Die Vererbbarkeit strahleninduzierter transmissibler Aberrationen wurde von deren Komplexität trotz zunehmender genetischer Veränderungen nicht beeinflusst. Die Anteile der Kolonien mit strahleninduzierten klonalen Aberrationen waren nach Bestrahlung (Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u]) mit 5 Treffern niedriger als mit 1 Treffer. Dies ist zum einen auf die geringere Reparierbarkeit komplexerer Chromosomenschäden wie auch auf die Zunahme der Anteile von Zellen mit nicht-transmissiblen Aberrationen zurückzuführen, was beides zu einer deutlicheren Inaktivierung der mit 5 Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] getroffenen Zellen führte.**

##### **4.3.3 Entwicklung der Proteinexpression in klonogenen Nachkommen von AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen**

In den direkten Nachkommen der gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen aus den Mikrosonden-Experimenten sowie von im Mittel mit vier Kohlenstoff-Ionen [0,5 Gy; 9,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen aus „broadbeam“-Experimenten wurde die Expression der zellzyklusregulierenden Proteine p53, p21 und p16 mittels der „In Cell Western“-Methode untersucht (siehe Abschnitt 3.2.5). Von Interesse war dabei vor allem, ob es mit dem Erreichen der Senseszenz zu einer abweichenden Expression zellzyklusregulierender Proteine zwischen den Nachkommen schein- und mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen in den Kolonien kam. Dafür wurde mit der Proteinexpression junger AG1522D-Zellen verglichen.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

Die Expression der untersuchten Proteine in nicht bestrahlten mitotisch aktiven AG1522D-Zellen, die in ihrer Morphologie dem mitotisch aktiven Stadium II (MFII) entsprachen, unterschied sich nicht oder nur geringfügig von jungen AG1522D-Zellen (Abbildung 3.35). In Kolonien mit Zellen postmitotischer Differenzierungsstadien wurden in Nachkommen scheinbestrahlter wie auch mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen hauptsächlich erhöhte zelluläre Mengen von p16 beobachtet (Abbildung 3.36). In den Massenkulturen gingen diesem Anstieg der p16-Expression eine Akkumulation von p53 und eine Induktion von p21 voraus (siehe Abschnitt 4.1.3). Da in keiner der Kolonien signifikant erhöhte zelluläre Mengen von p53 und p21 im Vergleich zu jungen AG1522D-Zellen festgestellt wurden, waren die Zellen der Kolonien zum Analysenzeitpunkt wahrscheinlich in der Entwicklung schon weiter fortgeschritten. Dies wird unterstützt durch Daten der morphologischen Differenzierung, die parallel zur vorliegenden Arbeit in Kolonien scheinbestrahlter und mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen bestimmt wurde und ein allgemein fortschritteneres zelluläres Alter der Zellen zeigt (Abbildung 4.14). Auffallend war dabei, dass die Nachkommen der bestrahlten im Vergleich zu scheinbestrahlten Zellen in ihren morphologischen Differenzierungsstadien bereits weiter fortgeschritten waren. Die höheren Differenzierungsstadien der Nachkommen bestrahlter Zellen in Kolonien stehen im Einklang mit der in Massenkulturen bestrahlter Zellen beobachteten frühzeitigen Seneszenz und fortgeschrittenen Differenzierung von Fibroblasten (Fournier *et al.* 2007, Zahnreich *et al.* 2010), was mit einem zeitlich früheren Anstieg der zellulären Mengen von p21 und p16 in den Nachkommen bestrahlter im Vergleich zu scheinbestrahlten Zellen einherging (Fournier *et al.* 2007).



**Abbildung 4.14:** Mittlere Anteile scheinbestrahlter oder mit einem (0,2 Gy) oder fünf (1 Gy) Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen in Kolonien mit mitotischen (MFII/III) oder postmitotischen (PMFs) morphologischen Differenzierungsmustern. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

**Insgesamt wurden damit in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede der Expression der untersuchten zellzyklusregulierenden Proteine beim Vergleich von mitotisch aktiven und damit koloniebildenden Zellen in Kontrollen und in mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG5122D-Zellen festgestellt. In seneszenten Zellen wurde unabhängig von vorangegangener Bestrahlung eine deutliche Induktion des in seneszenten Zellen häufig vertretenen CDK-Inhibitors p16 beobachtet. Dennoch zeigten die Nachkommen bestrahlter Zellen eine fortgeschrittenere Differenzierung und damit zelluläres Alter im Vergleich zu Kontrollen.**

#### **4.3 Langzeitentwicklung von AG5122D-Zellen nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion in Massenkulturen**

Die gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] an der Mikrosonde bestrahlten AG1522D-Zellen wurden neben Kolonien ebenfalls parallel in zwei Massenkulturen (Kultur 1 und 2) kultiviert. Ziel war es, den spezifischen Effekt der dicht-ionisierenden Kohlenstoff-Ionen vom Einfluss der Populationsdynamik in Massenkulturen auf die Selektion von Zellen zu trennen. Zur besseren Übersicht ist in Tabelle 4.3 ein Vergleich von Proliferation, chromosomalen Aberrationen, Proteinexpression und Differenzierung mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten bestrahlter AG1522-Zellen verschiedener Experimente der vorliegenden Arbeit sowie der Literatur zusammengestellt.

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

**Tabelle 4.3:** Vergleich der Proliferation, zytogenetischen Veränderungen, Langzeitentwicklung der Expression zellzyklusregulierender Proteine und morphologischen Differenzierung in Nachkommen mit Röntgenstrahlung oder Kohlenstoff-Ionen verschiedener Ionisationsdichten [Mikrosonde: 4,8 MeV/u, „broadbeam“: 9,8 MeV/u] bestrahlten AG1522-Zellen, die in Massenkulturen oder Kolonien kultiviert wurden, aus der vorliegenden sowie anderen Arbeiten (Winter 2007, Fournier *et al.* 2007, Zahnreich *et al.* 2010). (KO = Vergleichbar mit der Kontrolle der jeweiligen Experimente).

		Proliferation	Instabile Aberrationen	klonale chromosomale Aberrationen		Expression zellzyklus-regulierender Proteine	Differenzierung
				spontan	strahlen-induziert		
<b>Kolonien</b>	Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] vorliegende Arbeit (0,2/1 Gy)	KO	KO	deutlich weniger als in Kontrollen	vergleichbar mit Initialschaden (stabile Weitergabe)	KO	fortgeschrittener als KO
	Röntgenstrahlung vorliegende Arbeit (2/8x2 Gy)	KO	KO	weniger als in Kontrollen	vergleichbar mit Initialschaden (stabile Weitergabe)	-	-
<b>Massenkulturen</b>	Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] vorliegende Arbeit (0,2 Gy)	KO	KO	leicht mehr als in Kontrollen	deutlich weniger im Vergleich zu Kolonien (Selektion)	KO	-
	Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] (2/4 Gy) (Fournier <i>et al.</i> 2007, Winter 2007, Zahnreich <i>et al.</i> 2010)	frühzeitige replikative Seneszenz	KO	deutlich weniger als in Kolonien (Selektion nicht oder weniger geschädigter Zellen)		KO aber frühzeitig (entspricht Proliferation)	fortgeschrittener als KO (entspricht Proliferation)
	Röntgenstrahlung (2/8/8x2/16 Gy) (Fournier <i>et al.</i> 2007, Winter 2007, Zahnreich <i>et al.</i> 2010)	frühzeitige replikative Seneszenz	Zunahme bei hohen Dosen (8x2/16 Gy)	deutlich weniger als in Kolonien (Selektion nicht oder weniger geschädigter Zellen)		KO aber frühzeitig (entspricht Proliferation)	fortgeschrittener als KO (entspricht Proliferation)

##### **4.3.1 Proliferation der Nachkommen gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten AG1522D-Zellen in Massenkulturen**

Die Ausdehnung der Phase aktiver Proliferation war in der Kontrollpopulation und in den Nachkommen der bestrahlten Zellen gleich (Abbildung 3.37). Dies wurde für die Nachkommen bestrahlter Zellen aus Kolonien ebenfalls beobachtet (siehe Abschnitt 4.2.3.1). In zuvor durchgeführten „broadbeam“-Experimenten (Winter 2007, Zahnreich *et al.* 2010) wurde im Gegensatz dazu für mit höheren Dosen bestrahlte Populationen (2 und 4 Gy Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u]; 2 / 8 / 8x2 Gy Röntgenstrahlung) ein frühzeitiges Einsetzen der replikativen Seneszenz im Verhältnis zu Kontrollen beobachtet. Dies wurde auf einen von der Strahlenqualität unabhängigen zellulären Späteffekt der Strahlenexposition zurückgeführt. Die hier im Experiment verwendete niedrige Dosis (0,2 Gy) für Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] ist selbst für dicht-ionisierende Strahlung offensichtlich nicht ausreichend, um eine frühzeitige Seneszenz in den Nachkommen bestrahlter Zellen herbeizuführen.

##### **4.3.2 Zytogenetische Veränderungen in Nachkommen gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten AG1522D-Zellen in Massenkulturen**

In den beiden Massenkulturen der Nachkommen ursprünglich mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen wurden in zeitlicher Nähe zur replikativen Seneszenz keine Unterschiede bezüglich der Anteile von Zellen mit sporadischen chromosomalen Aberrationen im Vergleich zu anderen Kontrollpopulationen festgestellt (Abbildung 3.37).

Im Gegensatz zur Kontrolle wurden in beiden Massenkulturen bestrahlter Zellen allerdings klonale Aberrationen detektiert, die deutlich expandierten (Tabelle 3.8). Dies war in anderen Experimenten aber bereits in Kontrollen der Fall (siehe Abschnitte 4.1.2.3 und 4.2), sogar in nicht bestrahlten Zellen aus Kolonien des gleichen Experiments (Tabelle 3.3). Es fiel auf, dass in allen Populationen an mindestens 50 % der transmissiblen Aberrationen Chromosom 14 beteiligt war. Dies stellt ein Muster dar, das bereits für spontane entstandene klonale Aberrationen in Kolonien schein-bestrahlter und bestrahlter Zellen beobachtet wurde (siehe Abschnitt 4.2.3.3) und eine spenderabhängige Instabilität des Chromosom 14 in den für die vorliegende Arbeit verwendeten AG1522D-Zellen für Bestrahlungs-Experimente bestätigt. Im Gegensatz zu Kolonien kam es in Massenkulturen allerdings nur in den Nachkommen der bestrahlten Zellen zur klonalen Expansion dieser Aberrationen, die aber nur sehr schwach war (maximal 3 % der analysierten Metaphasen). Zwar war Chromosom 14 auch an den am deutlichsten klonal expandierenden Aberrationen in den Massenkulturen der mit einem Koh-

#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

lenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG5122D-Zellen beteiligt, aber diese Aberrationen entsprachen nicht den typischen Mustern, die im Zusammenhang mit einer sporadischen Instabilität von Chromosom 14 in Kolonien von AG1522D-Zellen beobachtet wurden. Letztere waren in allen Fällen Translokationen bzw. möglicherweise Duplikationen chromosomalen Materials am p-Arm von Chromosom 14 (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Die am deutlichsten expandierenden klonalen Aberrationen in den Nachkommen bestrahlter AG1522D-Zellen in Massenkulturen zeigten davon abweichende Aberrationsmuster in Form einer komplexen Aberration ((11'-13) (13'T) (14'-11), Kultur 1, Tabelle 3.8) und einer unvollständigen Translokation mit einem deletierten Donorchromosom ((14'-18) (del 18'T), Kultur 2, Tabelle 3.8). Aufgrund dieser Unregelmäßigkeiten und der hohen Expansionsraten dieser Aberrationen ist es daher wahrscheinlich, dass sie durch Bestrahlung in den Ursprungszellen der Populationen entstanden sind. Zur besseren Absicherung dieser Aussage wäre die zytogenetische Analyse früherer Zeitpunkte in der Massenkultur notwendig gewesen, was aber wegen der nur sehr geringen Anzahl verfügbarer Zellen nicht möglich war.

Im Vergleich zu Anteilen stabiler AG5122D-Zellen 44 h nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] (50 %, Abbildung 4.12) und Kolonien (30 %, Abbildung 4.12) mit strahleninduzierten transmissiblen Aberrationen, wurden in beiden Massenkulturen der mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen aber deutlich weniger Zellen mit transmissiblen Aberrationen, die möglicherweise auf die Bestrahlung zurückgehen könnten, detektiert (Tabelle 3.8). Dies bestätigt die bereits diskutierte Selektion von wenigen Zellen mit proliferativen Vorteilen in den Massenkulturen der Nachkommen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten im Vergleich zu nicht bestrahlten AG1522D-Zellen.

##### **4.3.3 Langzeitentwicklung der Proteinexpression in gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion bestrahlten AG1522D-Zellen in Massenkulturen**

In beiden untersuchten Massenkulturen der Nachkommen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG5122D-Zellen wurde eine zu Kontrollzellen vergleichbare und für diese Fibroblastenlinie charakteristische Expression und Akkumulation der untersuchten zellzyklusregulierenden Proteine beobachtet (siehe Abschnitt 4.1.3). Es kam mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz in allen Populationen zu einem transienten Anstieg der zellulären Mengen von p53 und p21, teilweise auch von p27 und p16 in seneszenten AG1522D-Zellen. Höhere zelluläre Mengen von p16 wurden ebenfalls in den seneszenten Nachkommen nicht-bestrahlter und mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen in Kolonien beobachtet (siehe Abschnitt 3.2.6.2).

Trotz der im Vergleich zur Kontrollpopulation deutlicheren Expansion von Zellen mit klonalen chromosomalen Aberrationen in Massenkulturen der mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8



#### 4. – Diskussion – Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter Fibroblasten

MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen, hatte dies damit keinen Einfluss auf die Expression bzw. Akkumulation der in der vorliegenden Arbeit untersuchten zellzyklusregulierenden Proteine. Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte sich auch in Massenkulturen von AG1522D-Zellen, die in „broadbeam“-Experimenten mit deutlich höheren Fluenzen und zwar im Mittel mit 15 und 30 Kohlenstoff-Ionen [2/4 Gy; 9,8 MeV/u] pro Zellkern bestrahlt wurden (Winter 2007, Fournier *et al.* 2007). In diesen Experimenten kam es mit einem im Vergleich zur Kontrolle vorzeitigen Einsetzen der replikativen Seneszenz ebenfalls zu einem früheren Anstieg der zellulären Mengen der CDK-Inhibitoren p21 und p16.

**In den Nachkommen der ursprünglich mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen, die in zwei Massenkulturen kultiviert wurden, kam es trotz der deutlichen Expansion von Zellen mit klonalen Aberrationen zu keinen Unterschieden bezüglich des Proliferationsverhaltens, der Anteile von Zellen mit instabilen Aberrationen und der Expression zellzyklusregulierender Proteine im Vergleich zur Kontrollpopulation.**

**Ein Teil der transmissiblen Aberrationen waren unabhängig von Bestrahlung durch eine spenderabhängige Instabilität von Chromosom 14 bedingt. Die am deutlichsten expandierenden klonalen Aberrationen in den Nachkommen der bestrahlten Zellen wurden aber wahrscheinlich durch die Bestrahlung erzeugt. Der Anteil von Zellen mit transmissiblen Aberrationen, im Vergleich zur ursprünglich erzeugten Anzahl von stabilen Zellen mit strahleninduzierten transmissiblen Aberrationen, war dennoch sehr gering (> 10-fach reduziert). Durch die Bestrahlung induzierte transmissible Aberrationen, von denen einzelne teilweise stark klonal expandierten, brachten aber einen Überlebensvorteil für die betroffenen Zellen, der zur Ausdehnung der proliferativen Phase der Gesamtpopulation beigetragen hat. Dieser könnte, neben der relativ niedrigen Dosis, ein Grund dafür sein, dass in den Nachkommen der bestrahlten Zellen kein verfrühter Eintritt in die replikative Seneszenz festgestellt wurde.**

#### 4.4 ROS-Akkumulation in Fibroblasten nach Bestrahlung

Erhöhte intrazelluläre ROS-Mengen werden in Verbindung bzw. als Auslöser verschiedener zellulärer Effekte wie Zellzyklusarrest (Chen und Ames 1994, Tulard *et al.* 2003), Apoptose (Chen *et al.* 2003, Limoli *et al.* 1998), genomischer Instabilität (Clutton *et al.* 1996, Limoli *et al.* 2003) wie auch neoplastischer Transformation von Zellen (Redpath und Gutierrez 2001) diskutiert. Ein durch oxidativen Stress ausgelöster permanenter oder transienter Zellzyklusarrest wurde in Fibroblasten nach Behandlung der Zellen mit oxidativen Agentien (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Chatterjee *et al.* 2009, Chen und Ames 1994, Chen *et al.* 1995) oder Kultivierung unter hy-

#### 4. Diskussion – ROS-Akkumulation in Fibroblasten nach Bestrahlung

peroxischen Bedingungen (Klimova *et al.* 2009, Saretzki *et al.* 1998, von Zglinicki *et al.* 1995) festgestellt. Die physiologische Erzeugung von ROS nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung wird hauptsächlich auf eine Schädigung mitochondrialer DNA und damit der Elektronentransportkette zurückgeführt (Prithivirajasingh *et al.* 2004, Leach *et al.* 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen hatten das Ziel, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten frühzeitiger Seneszenz oder genomischer Instabilität und erhöhten intrazellulären ROS-Niveaus zu erkennen. Aufgrund der hohen Zellzahlen die für die Messungen benötigt werden, konnten nur „broadbeam“-Experimente, mit anschließender Weiterführung der bestrahlten Zellen in Massenkulturen durchgeführt werden. Da keine signifikanten und systematischen Unterschiede in den detektierten DCF- oder DHE-Fluoreszenzintensitäten und damit der vorliegenden Radikalspezies detektiert wurden, werden diese für die Diskussion gemeinsam betrachtet.

##### 4.4.1 Frühe ROS-Akkumulation in Fibroblasten nach Bestrahlung

Da die innerhalb der ersten Tage nach Bestrahlung gemessenen intrazellulären ROS-Mengen in der vorliegenden und anderen Arbeiten aus der gleichen Arbeitsgruppe (Dettmering 2010, Colindres 2008) stark schwanken, sind Aussagen über Unterschiede in der strahleninduzierten ROS-Akkumulation in den verschiedenen untersuchten Fibroblastenlinien nicht möglich, auch wenn aus der Literatur Hinweise auf unterschiedliche antioxidative Kapazitäten und natürliche ROS-Niveaus von Fibroblasten aus verschiedenen Ursprungsgeweben vorliegen (Serra *et al.* 2003, Lorenz *et al.* 2001).

Alle der untersuchten Fibroblastenlinien der vorliegenden Arbeit zeigten für Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen verschiedener Ionisationsdichten [9,8 MeV/u, 100 MeV/u], bei Messungen in zeitlichen Intervallen von 3 Tagen, maximale intrazelluläre ROS-Mengen zum ersten Analysenzeitpunkt 3 Tage nach Bestrahlung. Diese blieben meist bis 6 Tage nach Bestrahlung unverändert und das Kontrollniveau wurde 9 Tage nach der Bestrahlung wieder annähernd erreicht (siehe Abschnitt 3.3). Für die Wirkung von Röntgenstrahlung sind ähnliche Daten für IMR-90 Zellen publiziert (Rugo *et al.* 2002). Der Zeitpunkt des Absinkens der durch Bestrahlung erhöhten intrazellulären ROS-Menge deckt sich zwar mit dem Rückgang verschiedener Marker für Differenzierung, Zellzyklusarrest und Seneszenz (Fournier *et al.* 2007, Fournier *et al.* 2001), ein direkter Zusammenhang zum Wiedereintritt von verzögerten Zellen in den Zellzyklus ist aber nicht wahrscheinlich, da ein Absinken der intrazellulären ROS-Mengen auch für hohe Röntgendosen beobachtet wurde, bei denen ein Zellzyklusarrest für die meisten bestrahlten Zellen länger als 9 Tage anhält (Dettmering 2010).

Gegen einen direkten Zusammenhang spricht auch, dass die beobachtete Zunahme von intrazellulären ROS bei niedrigen Dosen deutlich ist, was sich insbesondere bei höherer Io-

#### 4. Diskussion – ROS-Akkumulation in Fibroblasten nach Bestrahlung

nisationsdichte zeigt, aber mit steigender Dosis nicht mehr verstärkt wird. Im Gegensatz dazu nimmt die Anzahl der im Zellzyklus verzögerten Zellen sowie die zeitliche Ausdehnung der Verzögerung bei hohen Dosen noch deutlich zu (Fournier *et al.* 2007). Es ist vielmehr zu erwarten, dass die intrazelluläre Abwehr von oxidativem Stress nach mehreren Tagen ihre Wirkung voll entfaltet (Tulard *et al.* 2003), die in den hier untersuchten Fibroblasten offenbar nicht durch das Ausmaß von strahleninduzierten Schäden beeinflusst wird.

##### 4.4.2 Langzeitentwicklung der ROS-Akkumulation nach Bestrahlung

In den Nachkommen aller ursprünglich mit Röntgenstrahlung oder niederenergetischen Kohlenstoff-Ionen [9,8 MeV/u] bestrahlten Fibroblasten wurden bei Messungen kurz vor sowie nach Erreichen der replikativen Seneszenz keine Unterschiede zu relativen zellulären ROS-Mengen ebenfalls gealterter Kontrollpopulationen festgestellt. In lymphoblastoiden Zellen (TK6) haben sich zwar Hinweise auf erhöhte intrazelluläre ROS-Mengen in klonogenen Kolonien, die aus ursprünglich mit Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen hervorgingen und etwa 55 Generationen nach der Bestrahlung untersucht wurden ergeben (Rugo und Schiestl 2004), allerdings wurden in den Nachkommen der bestrahlten Zellen erhöhte Expressionsniveaus antioxidativer Enzyme im Vergleich zu Kontrollen detektiert, was auf die Aktivierung antioxidativer Schutzmechanismen hinweist. Ebenfalls in etablierten immortalen Zellen wurden persistent erhöhte zelluläre ROS-Mengen in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen beobachtet und mit frühzeitiger Seneszenz, chromosomaler Instabilität, reproduktivem Zelltod oder erhöhten Mutationsraten in Zusammenhang gebracht wurden (Limoli *et al.* 1997).

**Der beobachtete strahleninduzierte Anstieg intrazellulärer ROS-Mengen geht nach etwa 9 Tagen auf Kontrollniveau zurück, zeitgleich mit dem Wiedereintritt von Zellen, die in der Zellzyklusprogression verzögert sind. Ein direkter Zusammenhang ist aber unwahrscheinlich, vielmehr könnte es sich um die Wirkung der zellulären Abwehrmechanismen gegen oxidative Schäden handeln. Diese sind offensichtlich so wirksam, dass auch in Zellen kurz vor Erreichen der Seneszenz, wenn unbestrahlte Zellen ein deutlich höheres ROS-Niveau als junge Zellen zeigen (siehe Abschnitt 3.3.5), kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und den Nachkommen bestrahlter Zellen gefunden wurde.**

#### 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick: Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wurde die genotoxische Wirkung dicht-ionisierender Strahlung auf die genomische Stabilität sowie Seneszenz und Differenzierung der Nachkommen ursprünglich bestrahlter normaler humaner Fibroblasten untersucht.

Der verfrühte Eintritt in die Seneszenz und terminale Differenzierungsstadien sind entscheidende Elemente der genomischen Stabilität von Fibroblasten. Ob und in welchem Maß Seneszenz und Differenzierung in Fibroblasten auch *in vivo* eine Rolle spielt oder ob sie ein Artefakt der *in vitro* Kultivierung von Zellen darstellen, wird kontrovers diskutiert (Übersicht in: (Rubin 2002, 1997)). Hinweise, dass Seneszenz, die zwar nicht mit einer terminalen Differenzierung der Zellen gleichzusetzen ist, aber auch Differenzierung von Fibroblasten *in vivo* auftritt, liegen vor (Campisi und d'Adda di Fagagna 2007, Hornsby 2002, Dimri *et al.* 1995, Herskind *et al.* 1998). Wie diese erreicht wird und welche Prozesse dafür verantwortlich sind, ist bisher allerdings nicht geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass in Fibroblasten auch *in vivo* eine Verkürzung der Telomersequenzen mit zunehmendem Spenderalter auftritt (Geigl *et al.* 2004, Allsopp *et al.* 1992), was ebenfalls einen Indikator der Proliferation dieser Zellen *in vivo* darstellt und möglicherweise einen Beitrag zum Eintritt in die replikative Seneszenz leistet.

Da Fibroblasten *in vivo* als Einzelzellen in der ECM vorliegen und bei der Wundheilung oder Entzündung proliferieren, ist prinzipiell eine klonale Weitergabe (strahleninduzierter) chromosomaler Aberrationen ebenfalls *in vivo* vorstellbar und zu berücksichtigen. Dies ist von Interesse, da die klonale Selektion von Zellen mit genetischen Veränderungen wie Translokationen oder Gen-Amplifikationen als ein Mechanismus der Tumorentstehung (Chow und Rubin 2000, Mahale *et al.* 2008, Talmadge 2007) und, im Hinblick auf das hier verwendete Zellsystem, auch der selten auftretenden Fibrosarkome diskutiert wird (Morgan *et al.* 1991, Mahale *et al.* 2008, Sharpless *et al.* 2001, Lazar *et al.* 2006).

Die Frage ob Fibroblasten in funktionellen Einheiten wie Geweben und Organen als Folge von Bestrahlung verfrüht in die Seneszenz oder terminale Differenzierungsstadien eintreten ist deshalb wichtig, da diese zumindest *in vitro* eine veränderte Gen-Expression von Zellzyklusinhibitoren, aber auch für Proteine der ECM, Wachstumsfaktoren und Zytokine zeigen (Shelton *et al.* 1999). Die dadurch ausgeübte parakrine Wirkung trägt unter anderem zur Differenzierung von Keratinozyten oder Epithelzellen bei (Funk *et al.* 2000, Parrinello *et al.* 2005), was mit Veränderungen der Gewebestruktur, lokalen Entzündungsreaktionen und letztlich dem Verlust der Regenerationsfähigkeit und Funktion von Geweben diskutiert wird. In diesem Zusammenhang ist daher eine mögliche strahleninduzierte Zunahme der Anteile

#### 4. Diskussion – Schlussfolgerung und Ausblick: Langzeitentwicklung bestrahlter Fibroblasten

frühzeitig seneszenzter und differenzierter Fibroblasten *in vivo* von Interesse, die deutliche Effekte auf umliegende Zellen und damit das Gewebe haben könnte.

Auf ein geringes genetisches Risiko einer Exposition von dicht-ionisierender Strahlung weist hin, dass alle Nachkommen bestrahlter Zellen, unabhängig von auftretender genomischer Instabilität, die Proliferation letztendlich irreversibel einstellten und keine zelluläre Transformation beobachtet wurde. Diese Ergebnisse reflektieren die seltenen Transformationsereignisse von Fibroblasten (Morales *et al.* 1999, Shay *et al.* 1993, Shay und Wright 1989), für die es 6-8 unabhängiger Mutationen von Tumorsuppressor- oder Proto-Onkogenen bedarf (Fearon und Vogelstein 1990, Rangarajan und Weinberg 2003). Entsprechend selten werden Fibrosarkome, deren Ursprungszellen Fibroblasten darstellen, beobachtet (0,2 % aller malignen humanen Tumore (Pories *et al.* 1983)).

Wie bereits für nicht bestrahlte Fibroblasten festgestellt (siehe Abschnitt 4.1.5), sind auch nach einer vorangegangenen Strahlenexposition die Zellzyklusregulierung, antioxidative Schutzmechanismen und verfrühte Differenzierung und Seneszenz sehr effiziente Barrieren zur Vermeidung genomischer Instabilität in Fibroblasten. Insgesamt weisen die Ergebnisse für eine Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen nicht auf ein durch Strahlung erhöhtes Risiko für eine Destabilisierung des Genoms hin, was für hohe Dosen Röntgenstrahlung nicht uneingeschränkt gesagt werden kann.

## 5. Anhang

### A.1 Chemikalien und Kits

#### Chemikalien:

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid 30%, 37,5:1	Sigma-Aldrich
AEBSF (4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfonid)	Sigma-Aldrich
Antifade	Vectashield
Aprotinin	Sigma-Aldrich
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich
Bradford-Lösung (Coomassie Brilliant Blau G250)	Roth
Calyculin A	Alomone Labs
Cell-Tak®	Beckton-Dickinson
CASYTON Messlösung	Schärfe System
Colcemid	Roche Diagnostics GmbH
2'-7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich
DAPI	Serva
Dihydroethidium	Anaspec
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Merck
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	Biochrom AG
DRAQ5	Biostatus Limited
ECL+	GE Healthcare
EMEM with EBSS (Bio Whittaker™)	Cambrex Bio Science
Eisessig	Sigma-Aldrich
Ethanol p.a.	Merck
EDTA-Trypsin-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,1 % EDTA)	PAN Biotech GmbH
Fetal Bovine Serum (FCS)	Biochrom AG
Formaldehydlösung (37 %)	Merck
Glutamin (N-Acetyl-L-analyt-L-glutamine 200 mM)	Biochrom AG
Glycerin	Sigma-Aldrich
Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck
Hoechst-3342 (Bisbenzimidazol trihydrochlorid)	Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Mecaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck
Methylenblau	Merck
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich
Odyssey Blocking Buffer®	LI-COR Biosciences
PBS <sup>-/-</sup> Dulbecco (ohne Calcium und Magnesium)	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin (1000U/1000µg/ml)	Biochrom AG
RotiQuant®	Roth
Salzsäure	Merck
Sapphire700	LI-COR Biosciences
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich
SSC (Saline Sodium Citrat) 20x	Sigma-Aldrich
TEMED (Tetramethylethylenediamin)	Merck
TRIS base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)	Applchem
Telomere PNA FISH Kit/Cy3	Dako Cytomation
Triton-X-100	Merck
Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich

**Kits:**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
AneuVysion® Multicolor DNA Probe Kit	Abbott Molecular
B-test Detection Kit	Metasystems
Telomere PNA FISH Kit/Cy3	Dako Cytomation

**A.2 Lösungen und Puffer**

**A.2.1 Zellinaktivierung, morphologische Färbung**

**3 x Methylenblau-Lösung:**

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Ansatz</b>	<b>Stammlösung</b>
Löfflers Methylenblau-Lösung	30 % v/v	300 ml	
Kaliumhydroxid	9 % v/v	90 ml	0,1 %
Methanol	5 % v/v	5 ml	
Wasser		ad 1000 ml	

**A.2.2 Chromosomenanalysen**

**Chromosomenpräparation**

**KCl-Lösung:**

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
KCl	0,075 mol/l (5,61 g/l)

**Fixativ:**

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Methanol	3 Teile
Eisessig	1Teil

**Sörensen-Puffer:**

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Dinatriumhydrogenphosphat	0,067mol/l (24 g/l)
Kaliumdihydrogenphosphat	0,067 mol/l (5,61 g/l)

**Giemsa-Lösung (10 %):**

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>
Giemsa	10 % v/v in Sörensen-Puffer

**mFISH/mBAND/Telomer-FISH:**

<b>Bestandteil</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Ansatz</b>	<b>Stammlösung</b>
EtOH	90 % v/v	50 ml	
EtOH	70 % v/v	50 ml	
EtOH	50 % v/v	50 ml	
EtOH	30 % v/v	50 ml	
Formaldehyd	3,7 % v/v	50 ml	Formaldehyd (37 %)
NaOH	0,07 mol/l	50 ml	1 mol/l
SSC	0,1 x	50 ml	20 x
SSC	0,2 x	50 ml	20 x
SSC	1 x	50 ml	20 x
SSC	2 x	50 ml	20 x

#### 4 x SSCT:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
SSC	4 x	40 ml	20 x SSC
Tween 20	0,05 % v/v	1 ml	
Wasser		ad 200 ml	

#### Interphase-FISH:

##### Denaturierungs-Lösung:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
SSC	2 x	5 ml	20 x
Formamid	70 % v/v	35 ml	
Wasser		ad 50 ml	

##### Wasch-Lösung I:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
SSC	0,4 x	1 ml	20 x
NP-40	0,3 % v/v	1,5 ml	
Wasser		ad 50 ml	

##### Wasch-Lösung II:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
SSC	0,4 x	1 ml	20 x
NP-40	0,1 % v/v	0,5 ml	
Wasser		ad 50 ml	

### A.2.3 Western-Blotting und SDS-PAGE

#### Lysepuffer für Zellaufschluss:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Igepal CA-630	34 µmol/l	1000 µl	2% w/v
TRIS pH 7,6	50 mmol/l		+100 mmol/l, pH 7,6
Natriumchlorid	150 mmol/l		+300 mmol/l
EDTA	1 mmol/l		+2 mmol/l
Natriumdesoxycholat	12,1 µmol/l	500 µl	50 mmol/l
SDS	3,5 µmol/l	20 µl	350 mmol/l
AEBSEF	1 mmol/l	10 µl	200 mmol/l
Natriumfluorid	50 mmol/l	200 µl	500 mmol/l
Natriumorthovanadat	1 mol/l	10 µl	200 mmol/l
Aprotinin	153,6 nmol/l	20 µl	0,1 mg/ml
Wasser		240 µl	

#### SDS-Polyacrylamid-Trenngel, 12%:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
APS	0,0005 % v/v	0,1 ml	10% w/v
Acrylamid/Bisacrylamid	0,4 % v/v	8 ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid
Trenngel-Puffer	0,35 % v/v	7 ml	4 x Trenngel-Puffer
TEMED	0,0005 % v/v	0,01 ml	
Wasser	0,25 % v/v	5 ml	



### SDS-Polyacrylamid-Sammelgel, 3,2%:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Acrylamid/Bisacrylamid	0,11 % v/v	1 ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid
APS	0,0005 % v/v	0,1 ml	10% w/v
Sammelgel-Puffer	0,26 % v/v	2,4 ml	4 x Sammelgel-Puffer
TEMED	0,0005 % v/v	0,01 ml	
Wasser	0,63 % v/v	5,9 ml	

### 4 x Trenngel-Puffer:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Salzsäure		ad pH 8,8	37% Salzsäure
SDS	35,00 mmol/l	4 ml	10% w/v
TRIS base	150,00 mmol/l	18,2 g	
Wasser		ad 100 ml	

### 4 x Sammelgel-Puffer:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Salzsäure		ad pH 6,7	37% Salzsäure
SDS	35,00 mmol/l	4 ml	10% w/v
TRIS base	50,00 mmol/l	6,1 g	
Wasser		ad 100 ml	

### SDS-Laufpuffer für die Gelelektrophorese:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Glycin	190 mmol/l	14,26 g	
TRIS base	25 mmol/l	3,06 g	
SDS	3,5 mmol/l	1 g	
Wasser		ad 1000 ml	

### SDS-Probepuffer für den Probeauftrag:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Bromphenolblau	6,3 mmol/l	0,3 ml	0,2 mg/ml
Glycerin	6,7 mol/l	7 ml	
SDS	145,5 mmol/l	6 ml	10% w/v
TRIS pH6,7	69,9 mmol/l	1 ml	1 mol/l, pH 6,7

### Transferpuffer für den Western-Blot

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Glycin	150 mmol/l	16,9 g	
Methanol		300 ml	
SDS	3,5 mmol/l	15 ml	10% w/v
TRIS	13,3 mmol/l	20 ml	1 mol/l, pH 8,3
Wasser		1165 ml	

### TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20)-Lösung:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Natriumchlorid	150 mmol/l	500 ml	3 mol/l
TRIS	10 mmol/l	100 ml	1 mol/l, pH 8,0
Tween 20	450 µmol/l	5 ml	
Wasser		ad 1000 ml	

### Blocking-Lösung für die Detektion der Western-Blots:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz
Milchpulver	(1% w/w Fett)	5 % w/w (5 g)
TBST	95 % w/w	100 ml

### Ablösepuffer für die Neudetektion der Western-Blots (Stripping-Buffer):

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
2-Mercaptoethanol	100 mmol/l	714 µl	
SDS	20 mmol/l	6 ml	10% w/v
TRIS	200 mmol/l	20 ml	1 mol/l, pH 6,7
Wasser		74 ml	

### A.2.4 In Cell Western

#### Fixier-Lösung:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Formaldehyd	3,7 % v/v	1 ml	Formaldehyd (37 %)
Wasser		9 ml	

#### Triton-Wasch-Lösung:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Triton-X-100	0,1 %	5 ml	
PBS		495 ml	

#### Tween-Wasch-Lösung:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz	Stammlösung
Tween 20	0,1 %	5 ml	20 % Tween 20
PBS		995 ml	

### A.3 Medien und Seren für die Zellkultur

#### Kulturmedium für AG1522 Fibroblasten:

Bestandteil	Konzentration	Ansatz
EMEM Basis Medium mit EBSS	89,3 % v/v	500 ml
FCS	8,9 % v/v	50 ml
L-Glutamin	1,8 % v/v	5 ml
Penicillin/Streptomycin	1,8 % v/v	5 ml

#### Tiefkühlmedium für AG-Zellen

Bestandteil	Konzentration	Ansatz
EMEM Basis Medium mit EBSS	90 % v/v	18 ml
Glyzerin	10 % v/v	2 ml

#### Verwendete Seren, Antibiotika, Peptide und Trypsin

Zusatzstoff	Produkt	Bezugsquelle
Antibiotika 10 000 U/10 000 µg/ml	Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Peptide	N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	Biochrom AG
Serum	Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Trypsin	Trypsin (0,5g/l) + EDTA (1g/l)	PAN Biotech

## A.4 Antikörper

### Primär-Antikörper

Antigen	Typ	Spezies	Klon	Bezugsquelle	Konz.[µg/ml]	Verdünnung
Cyclin D1	m	Maus	DCS-6	Santa Cruz	200	1:250 (WB)
p16INK4a	m	Maus	DCS-50.1 A7	Labvision	200	1:250 (WB) 1:40 (ICW)
p21Cip1	m	Maus	G173-524	BDBiosciences	250	1:4000 (WB) 1:50 (ICW)
p53	m	Maus	DO-1	Merck	100	1:2000 (WB) 1:50 (ICW)
P27	m	Maus		BDBiosciences	250	1:250 (WB)
PCNA	m	Maus	PC10	Chemicon	500	1:4000 (WB)
Tubulin	m	Maus	B-5-1-2	Sigma-Aldrich	1000	1:4000 (WB)

Typ: m (monoklonal)

Verdünnung: WB (Western-Blot), ICW (In Cell Western)

### Sekundär-Antikörper

Antigen	Typ	Spezies	Klon	Bezugsquelle	Verdünnung
Maus IgG	Meerrettich- peroxidase	Schaf	NXA 931	Amersham	1:10 000(WB)
Kaninchen IgG	Meerrettich- peroxidase	Esel	NA 934	Amersham	1:10 000(WB)
Maus IgG	IRDye800CW	Ziege		LI-COR	1:800 (ICW)

Verdünnung: WB (Western-Blot), ICW (In Cell Western)

## A.5 Nukleinsäuresonden

Bezeichnung	Bezugsquelle
24xCyte mFISH kit for human chromosomes	MetaSystems
Telomere PNA FISH Cy3 probe	DakoCytomation
xCyte mBAND kit for human chromosome 9	MetaSystems
xCyte mBAND kit for human chromosome 17	MetaSystems
CEP 6 (D6Z1) SpectrumOrange Probe	Abbott Molecular
6p11.1-q11 Alpha Satellite DNA	
CEP 7 (D7Z1) SpectrumGreen Probe	Abbott Molecular
7p11.1-q11.1 Alpha Satellite DNA	

## A.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Produkt	Bezugsquelle
Blotmembranen	Immobilon-P, PVDF	Millipore
Filme Hyperfilm	ECL GE	Healthcare
Einmalpipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml Cellstar®	Greiner
Mikroreaktionsgefäße	0,5/1,5 ml	Greiner
Klebstoff	Fixogum	Marabu
Kryoröhrchen	Cellstar® CryoS.	Greiner
Mikrtiterplatten	96-well	Nunc GmbH
Labortücher	Kimwipes® Lite 100	Kimberly Clark®
Objektträger	76x26 mm	Roth
Pipettenspitzen		Brand
Whatman-Papier		Biometra
Zellkulturflaschen	12,5/25/75 cm <sup>2</sup>	Falcon
Zellzählgefäße	CASY cups10 ml	SchärfeSystem
Zentrifugenröhrchen	15ml	TPP

**A.7 Geräte und Software****Geräte**

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Autoklav	Autoklav EL	Tutthauer Systec
Dosimeter	SN4	PTW Freiburg
Durchflussszytometer	PAS III	Partec
Färbetröge	nach Coplin	Glaswerk Wertheim
Filmdigitalisierer	LS75	Kodak
Filmentwickler	Curix 60	Agfa-Gevaert
Filmkassette	X-Ray IEC 60406	REGO X-Ray
Flockeneisbereiter	NordCap SPR 80	Stettner Kühlanlagen
Folienschweißgerät	Futura Jr.	Audion Electro
Gelelektrophorese	Mini-Protean Cell Set	Bio-rad
Gefrierschrank -20°C		Liebherr
Gefrierschrank -80°C		Heraeus Instruments
Gelelektrophorese	Mini-Protean Cell Set	Bio-rad
Hybridisator	UniTherm 6/12	Kisker
„Infrared Imaging System“	Odyssey®	LI-COR Biosciences
Inkubatoren	Brutschrank BBD-6220	Heraeus Instruments
Kamera	CCD Kamera JAI M300	Stemmer Imaging
Kamera	Sensicam em	PCO Imaging
Kleinschüttler	KM-2 Edmund	Bühler
Mikroskop	motorisiertes BX-61	Olympus
	Fluoreszenzmikroskop mit Steuereinheit 3X-UCB	
Mikroskop	DMRB	Leica
Mikroskop	Leitz Aristoplan	Leica
Netzteil für Elektrophorese	Consort E844	Braun
pH-Meter	Calimatic 766	Knick
Pipetten	1/2/5/10/25 mL Glas	Hirschmann®, EM Techcolor
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences
Röntgenröhre	Isovolt DS1	Seifert
Schüttler	Kleinschüttler IKA MS2 S5	IKA
Schüttelwasserbad	Julabo SW20	Julabo
Sensitometer	Sensi C21	Pehhamed
Stereolupe		Zeiss
Sterilisator		Heraeus Instruments
Stickstoffbehälter	Locator 8 Plus	Thermolyne
Stickstoffbehälter	GT 80	Air Liquide
Tischwaage	440-45	Kern
Trockenschrank	T 6200	Thermo Electron
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Plus	Millipore, Eschborn
Waagen	Präzisionswaage Sartorius handy	Sartorius
Wasserbäder	M12/M20	Lauda
Werkbank	Herasafe HSP12	Kendro/Heraeus Instruments
Werkbank	Filtair 804N	Captair
Werkbank	LaminAir HLB 2448	Holten
Wärmeschrank	Hybridization Oven 6/12	Unitherm
Zellzählgerät	CASY® 1 Modell TT	Beckmann Coulter
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Electron
Zentrifuge	Tischzentrifuge SD	Fisher Scientific
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Electron

## Software

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Bildanalyse	ImageJ 1.41	National Institutes of Health
	Adobe Photoshop	Adobe Systems Incorporated
mFISH/mBAND-Analysen	ISIS	In Situ Imaging Systems
Durchflusszytometrie	FlowMax Operating and Analysis Software	Partec

## Literaturverzeichnis

- Absher P. M. und Absher R. G. (1976) Clonal variation and aging of diploid fibroblasts. Cinematographic studies of cell pedigrees. *Exp Cell Res*, **103**, 247-55.
- Al-Achkar W., Sabatier L. und Dutrillaux B. (1988) Transmission of radiation-induced rearrangements through cell divisions. *Mutat Res*, **198**, 191-8.
- Alberts B. (1994) *Molecular Biology of the Cell*.
- Alcorta D. A., Xiong Y., Phelps D., Hannon G., Beach D. und Barrett J. C. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13742-7.
- Aliouat-Denis C. M., Dendouga N., Van den Wyngaert I., Goehlmann H., Steller U., van de Weyer I., Van Slycken N., Andries L., Kass S., Luyten W., Janicot M. und Vialard J. E. (2005) p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res*, **3**, 627-34.
- Allen R. G. (1991) Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Proc Soc Exp Biol Med*, **196**, 117-29.
- Allen R. G. und Balin A. K. (1988) Developmental changes in the superoxide dismutase activity of human skin fibroblasts are maintained in vitro and are not caused by oxygen. *J Clin Invest*, **82**, 731-4.
- Allsopp R. C. und Harley C. B. (1995) Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res*, **219**, 130-6.
- Allsopp R. C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E. V., Futcher A. B., Greider C. W. und Harley C. B. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 10114-8.
- Anderson R. M., Marsden S. J., Wright E. G., Kadhim M. A., Goodhead D. T. und Griffin C. S. (2000) Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha-particles. *Int. J. Radiat. Biol.*, **76**, 31-42.
- Anderson R. M., Stevens D. L. und Goodhead D. T. (2002) M-FISH analysis shows that complex chromosome aberrations induced by alpha -particle tracks are cumulative products of localized rearrangements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12167-72.
- Appella E. und Anderson C. W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, **268**, 2764-72.
- Artandi S. E., Chang S., Lee S. L., Alson S., Gottlieb G. J., Chin L. und DePinho R. A. (2000) Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*, **406**, 641-5.
- Asaithamby A., Uematsu N., Chatterjee A., Story M. D., Burma S. und Chen D. J. (2008) Repair of HZE-particle-induced DNA double-strand breaks in normal human fibroblasts. *Radiat Res*, **169**, 437-46.
- Atamna H., Paler-Martinez A. und Ames B. N. (2000) N-t-butyl hydroxylamine, a hydrolysis product of alpha-phenyl-N-t-butyl nitron, is more potent in delaying senescence in human lung fibroblasts. *J Biol Chem*, **275**, 6741-8.
- Atkin N. B. (1986) Lack of reciprocal translocations in carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, **21**, 275-8.
- Bailey S. M., Cornforth M. N., Ullrich R. L. und Goodwin E. H. (2004) Dysfunctional mammalian telomeres join with DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, **3**, 349-57.
- Baird D. M., Rowson J., Wynford-Thomas D. und Kipling D. (2003) Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet*, **33**, 203-7.
- Balin A. K., Goodman B. P., Rasmussen H. und Cristofalo V. J. (1976) The effect of oxygen tension on the growth and metabolism of WI-38 cells. *J Cell Physiol*, **89**, 235-49.
- Barberet P., Heiá M., Du G., Fischer B. E. und Taucher-Scholz G. (2006) The GSI Heavy Ion Microbeam: A Tool for the Investigation of Cellular Response to High LET Radiations. *Acta Physica Polonica A*, **109**, 329.

- Barcellos-Hoff M. H. und Nguyen D. H. (2009) Radiation carcinogenesis in context: how do irradiated tissues become tumors? *Health Phys*, **97**, 446-57.
- Bartek J. und Lukas J. (2001) Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 738-47.
- Bauchinger M., Schmid E. und Braselmann H. (1986) Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiat Environ Biophys*, **25**, 253-60.
- Bayreuther K., Francz P. I., Gogol J., Hapke C., Maier M. und Meinrath H. G. (1991) Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems. *Mutat Res*, **256**, 233-42.
- Bayreuther K., Rodemann H. P., Hommel R., Dittmann K., Albiez M. und Francz P. I. (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **85**, 5112-6.
- Becher W., Konradt M., Lenz G., Lotz R., Ragaller I., Schaub H., Scholz M., Voss B. und G. K. (2001) A new irradiation facility for biological samples at the UNILAC. *GSI Scientific Report*.
- Bedi G. C., Westra W. H., Gabrielson E., Koch W. und Sidransky D. (1996) Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res*, **56**, 2484-7.
- Bell E., Marek L. F., Levinstone D. S., Merrill C., Sher S., Young I. T. und Eden M. (1978) Loss of division potential in vitro: aging or differentiation? *Science*, **202**, 1158-63.
- Ben-Porath I. und Weinberg R. A. (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest*, **113**, 8-13.
- Ben-Porath I. und Weinberg R. A. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **37**, 961-76.
- Benn P. A. (1976) Specific chromosome aberrations in senescent fibroblast cell lines derived from human embryos. *Am.J.Hum.Genet.*, **28**, 465-73.
- Benov L., Szejnberg L. und Fridovich I. (1998) Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med*, **25**, 826-31.
- Berger R. und Jonveaux P. (1996) Clonal chromosome abnormalities in Fanconi anemia. *Hematol Cell Ther*, **38**, 291-6.
- Bertoni L., Attolini C., Tessera L., Mucciolo E. und Giulotto E. (1994) Telomeric and nontelomeric (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in gene amplification and chromosome stability. *Genomics*, **24**, 53-62.
- Bertram C. und Hass R. (2008) Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. *Biol Chem*, **389**, 211-20.
- Bethe H. A. (1930) Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie. *Annalen der Physik*, **75**.
- Biesterfeld S., Gerres K., Fischer-Wein G. und Bocking A. (1994) Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J.Clin.Pathol.*, **47**, 38-42.
- Blackburn E. H. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell*, **106**, 661-73.
- Bloch F. (1933) Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch die Materie. *Annalen der Physik*.
- Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Muller S., Eils R., Cremer C., Speicher M. R. und Cremer T. (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS.Biol.*, **3**, e157.
- Borgmann K., Hoeller U., Nowack S., Bernhard M., Roper B., Brackrock S., Petersen C., Szymczak S., Ziegler A., Feyer P., Alberti W. und Dikomey E. (2008) Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **71**, 256-64.
- Borgmann K., Roper B., El-Awady R., Brackrock S., Bigalke M., Dork T., Alberti W., Dikomey E. und Dahm-Daphi J. (2002) Indicators of late normal tissue response after radiotherapy for head and neck cancer: fibroblasts, lymphocytes, genetics, DNA repair, and chromosome aberrations. *Radiother Oncol*, **64**, 141-52.
- Bosco G. und Haber J. E. (1998) Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture. *Genetics*, **150**, 1037-47.

- Bouffler S. D., Haines J. W., Edwards A. A., Harrison J. D. und Cox R. (2001) Lack of detectable transmissible chromosomal instability after in vivo or in vitro exposure of mouse bone marrow cells to 224Ra alpha particles. *Radiat Res*, **155**, 345-52.
- Boveris A. und Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, **134**, 707-16.
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Braselmann H., Bauchinger M. und Schmid E. (1986) Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulae for the determination of transmission and survival parameters of aberrations. *Radiat Environ Biophys*, **25**, 243-51.
- Bravard A., Hoffschir F., Sabatier L., Ricoul M., Pinton A., Cassingena R., Estrade S., Luccioni C. und Dutrillaux B. (1992a) Early superoxide dismutase alterations during SV40-transformation of human fibroblasts. *Int J Cancer*, **52**, 797-801.
- Bravard A., Sabatier L., Hoffschir F., Ricoul M., Luccioni C. und Dutrillaux B. (1992b) SOD2: a new type of tumor-suppressor gene? *Int J Cancer*, **51**, 476-80.
- Britt-Compton B., Wyllie F., Rowson J., Capper R., Jones R. E. und Baird D. M. (2009) Telomere dynamics during replicative senescence are not directly modulated by conditions of oxidative stress in IMR90 fibroblast cells. *Biogerontology*.
- Buselmaier W. und Tariverdian G. (1999) *Humangenetik*. Springer-Verlag Heidelberg Berlin.
- Buxser S. E., Sawada G. und Raub T. J. (1999) Analytical and numerical techniques for evaluation of free radical damage in cultured cells using imaging cytometry and fluorescent indicators. *Methods Enzymol*, **300**, 256-75.
- Cadenas E. (1997) Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors*, **6**, 391-7.
- Caldini R., Chevanne M., Mocali A., Tombaccini D. und Paoletti F. (1998) Premature induction of aging in sublethally H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated young MRC5 fibroblasts correlates with increased glutathione peroxidase levels and resistance to DNA breakage. *Mech Ageing Dev*, **105**, 137-50.
- Campisi J. (2001) Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.*, **11**, S27-S31.
- Campisi J. und d'Adda di Fagagna F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 729-40.
- Carrano A. V. und Heddle J. A. (1973) The fate of chromosome aberrations. *J Theor Biol*, **38**, 289-304.
- Carrano A. V., Minkler J. und Piluso D. (1975) On the fate of stable chromosomal aberrations. *Mutat Res*, **30**, 153-6.
- Carter S. B. (1967) Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*, **213**, 261-4.
- Chatterjee S., Kundu S., Sengupta S. und Bhattacharyya A. (2009) Divergence to apoptosis from ROS induced cell cycle arrest: Effect of cadmium. *Mut Res*, **663**.
- Chen C., Frierson H. F., Jr., Haggerty P. F., Theodorescu D., Gregory C. W. und Dong J. T. (2001a) An 800-kb region of deletion at 13q14 in human prostate and other carcinomas. *Genomics*, **77**, 135-44.
- Chen C. R., Wang W., Rogoff H. A., Li X., Mang W. und Li C. J. (2005) Dual induction of apoptosis and senescence in cancer cells by Chk2 activation: checkpoint activation as a strategy against cancer. *Cancer Res*, **65**, 6017-21.
- Chen J. H., Stoeber K., Kingsbury S., Ozanne S. E., Williams G. H. und Hales C. N. (2004) Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J Biol Chem*, **279**, 49439-46.
- Chen Q. und Ames B. N. (1994) Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4130-4.
- Chen Q., Chai Y. C., Mazumder S., Jiang C., Macklis R. M., Chisolm G. M. und Almasan A. (2003) The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ*, **10**, 323-34.



- Chen Q., Fischer A., Reagan J. D., Yan L. J. und Ames B. N. (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4337-41.
- Chen Q. M., Prowse K. R., Tu V. C., Purdom S. und Linskens M. H. (2001b) Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res*, **265**, 294-303.
- Chessa L., Nuzzo F., Stefanini M., Lagomarsini P. und del Porto G. (1990) Xeroderma pigmentosum: clonal chromosomal rearrangements in a pre-cancerous skin lesion. *Dis Markers*, **8**, 125-36.
- Chow M. und Rubin H. (2000) Clonal selection versus genetic instability as the driving force in neoplastic transformation. *Cancer Res*, **60**, 6510-8.
- Clutton S. M., Townsend K. M., Walker C., Ansell J. D. und Wright E. G. (1996) Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures. *Carcinogenesis*, **17**, 1633-9.
- Coats S., Flanagan W. M., Nourse J. und Roberts J. M. (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, **272**, 877-80.
- Colindres M. (2008) Reaktive Sauerstoffspezies: Charakterisierung zweier Messmethoden zum Nachweis intrazellulärer Radikale und Untersuchungen zur Bildung freier Radikale in Fibroblasten nach Beestrahlung. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Collado M., Medema R. H., Garcia-Cao I., Dubuisson M. L., Barradas M., Glassford J., Rivas C., Burgering B. M., Serrano M. und Lam E. W. (2000) Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem*, **275**, 21960-8.
- Cornforth M. N. (2001) Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. *Radiat Res*, **155**, 643-59.
- Cornforth M. N. und Bedford J. S. (1987) A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts. *Radiat Res*, **111**, 385-405.
- Cristofalo V. J., Lorenzini A., Allen R. G., Torres C. und Tresini M. (2004) Replicative senescence: a critical review. *Mech Ageing Dev*, **125**, 827-48.
- Cristofalo V. J. und Sharf B. B. (1973) Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells. *Exp Cell Res*, **76**, 419-27.
- d'Adda di Fagagna F., Reaper P. M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N. P. und Jackson S. P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, **426**, 194-8.
- Dayal D., Martin S. M., Limoli C. L. und Spitz D. R. (2008) Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells. *Biochem J*, **413**, 185-91.
- Dayal D., Martin S. M., Owens K. M., Aykin-Burns N., Zhu Y., Boominathan A., Pain D., Limoli C. L., Goswami P. C., Domann F. E. und Spitz D. R. (2009) Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation. *Radiat Res*, **172**, 737-45.
- de Lange T. (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, **19**, 2100-10.
- Dettmerring T. (2010) Investigations of the radiation-induced accumulation of reactive oxygen species in human fibroblasts. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K. und Wahl G. M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*, **8**, 2540-51.
- Difilippantonio M. J., Petersen S., Chen H. T., Johnson R., Jasin M., Kanaar R., Ried T. und Nussenzweig A. (2002) Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J Exp Med*, **196**, 469-80.
- Dimri G. P. (2005) What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*, **7**, 505-12.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I. und Pereira-Smith O. (1995) A biomarker that identifies senescent

- human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 9363-7.
- Dimri G. P., Martinez J. L., Jacobs J. J., Keblusek P., Itahana K., Van Lohuizen M., Campisi J., Wazer D. E. und Band V. (2002) The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, **62**, 4736-45.
- Doggett D. L., Rotenberg M. O., Pignolo R. J., Phillips P. D. und Cristofalo V. J. (1992) Differential gene expression between young and senescent, quiescent WI-38 cells. *Mech Ageing Dev*, **65**, 239-55.
- Droege W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**.
- Droege W. (2003) Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol*, **543**, 191-200.
- Duesberg P., (2007) Das Chaos in den Chromosomen. In: *Spektrum der Wissenschaft*. 54-64.
- Dugan L. C. und Bedford J. S. (2003) Are chromosomal instabilities induced by exposure of cultured normal human cells to low- or high-LET radiation? *Radiat Res*, **159**, 301-11.
- Dulic V., Drullinger L. F., Lees E., Reed S. I. und Stein G. H. (1993) Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11034-8.
- Dumont P., Burton M., Chen Q. M., Gonos E. S., Fripiat C., Mazarati J. B., Eliaers F., Remacle J. und Toussaint O. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, **28**, 361-73.
- Duran A., Barquinero J. F., Caballin M. R., Ribas M. und Barrios L. (2009) Persistence of radiation-induced chromosome aberrations in a long-term cell culture. *Radiat Res*, **171**, 425-37.
- Durante M., George K., Wu H. und Cucinotta F. A. (2002) Karyotypes of human lymphocytes exposed to high-energy iron ions. *Radiat Res*, **158**, 581-90.
- Durante M., Grossi G. F. und Yang T. C. (1996) Radiation-induced chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Adv Space Res*, **18**, 99-108.
- Durante M., Pignalosa D., Jansen J. A., Walboomers X. F. und Ritter S. (2010) Influence of nuclear geometry on the formation of genetic rearrangements in human cells. *Radiat Res*, **174**, 20-6.
- Duthu G. S., Braunschweiger K. I., Pereira-Smith O. M., Norwood T. H. und Smith J. R. (1982) A long-lived human diploid fibroblast line for cellular aging studies: applications in cell hybridization. *Mech Ageing Dev*, **20**, 243-52.
- Edgar B. A. und Orr-Weaver T. L. (2001) Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell*, **105**, 297-306.
- El-Deiry W. S., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parsons R., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. und Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-25.
- Elliott B. und Jasin M. (2002) Double-strand breaks and translocations in cancer. *Cell Mol Life Sci*, **59**, 373-85.
- Evans H. (1974) *Effects of ionizing radiation on mammalian chromosomes*. John Wiley & Sons New York.
- Fearon E. R. und Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-67.
- Ferbeyre G., de Stanchina E., Lin A. W., Querido E., McCurrach M. E., Hannon G. J. und Lowe S. W. (2002) Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol*, **22**, 3497-508.
- Fialkow P. J. (1976) Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta*, **458**, 283-321.
- Finkel T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 248-53.
- Fischer B. E., Heiß M. und Cholewa M. (2003) About the art to shoot with single ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **210**, 7.
- Forsti A., Luo L., Vorechovsky I., Soderberg M., Lichtenstein P. und Hemminki K. (2001) Allelic imbalance on chromosomes 13 and 17 and mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in monozygotic twins concordant for breast cancer. *Carcinogenesis*, **22**, 27-33.

- Forsyth N. R., Evans A. P., Shay J. W. und Wright W. E. (2003) Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging Cell*, **2**, 235-43.
- Fouladi B., Sabatier L., Miller D., Pottier G. und Murnane J. P. (2000) The relationship between spontaneous telomere loss and chromosome instability in a human tumor cell line. *Neoplasia*, **2**, 540-54.
- Fournier C., Kraft-Weyrather W. und Kraft G. (1998) Survival, differentiation and collagen secretion of human fibroblasts after irradiation with carbon ions and X-rays. *Phys Med*, **14 Suppl 1**, 44-7.
- Fournier C., Scholz M., Weyrather W. K., Rodemann H. P. und Kraft G. (2001) Changes of fibrosis-related parameters after high- and low-LET irradiation of fibroblasts. *Int.J.Radiat.Biol.*, **77**, 713-22.
- Fournier C., Wiese C. und Taucher-Scholz G. (2004) Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation. *Radiation Research*, **161**, 675-84.
- Fournier C., Winter M., Zahnreich S., Nasonova E., Melnikova L. und Ritter S. (2007) Interrelation amongst differentiation, senescence and genetic instability in long-term cultures of fibroblasts exposed to different radiation qualities. *Radiother.Oncol.*, **83**, 277-82.
- Fritz R. B., Russell J. P. und Zhao M. L. (1998) Persistence of an encephalitogenic T cell clone in the spinal cord during chronic, relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, **89**, 1-9.
- Funk W. D., Wang C. K., Shelton D. N., Harley C. B., Pagon G. D. und Hoeffler W. K. (2000) Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model. *Exp Cell Res*, **258**, 270-8.
- Gadbois D. M., Crissman H. A., Nastasi A., Habbersett R., Wang S. K., Chen D. und Lehnert B. E. (1996) Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays. *Radiat Res*, **146**, 414-24.
- Ganem N. J., Storchova Z. und Pellman D. (2007) Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **17**, 157-62.
- Gao C., Furge K., Koeman J., Dykema K., Su Y., Cutler M. L., Werts A., Haak P. und Vande Woude G. F. (2007) Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 8995-9000.
- Gartel A. L. und Tyner A. L. (1999) Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*, **246**, 280-9.
- Geigl J. B., Langer S., Barwisch S., Pflieghaar K., Lederer G. und Speicher M. R. (2004) Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging. *Cancer Res*, **64**, 8550-7.
- Gerhard G. S., Benko F. A., Allen R. G., Tresini M., Kalbach A., Cristofalo V. J. und Gocke C. D. (2002) Mitochondrial DNA mutation analysis in human skin fibroblasts from fetal, young, and old donors. *Mech Ageing Dev*, **123**, 155-66.
- Gire V. (2004) Dysfunctional telomeres at senescence signal cell cycle arrest via Chk2. *Cell Cycle*, **3**, 1217-20.
- Gire V., Roux P., Wynford-Thomas D., Brondello J. M. und Dulic V. (2004) DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J*, **23**, 2554-63.
- Gisselsson D. (2001) Refined characterisation of chromosome aberrations in tumours by multicolour banding and electronic mapping resources. *Methods Cell Sci*, **23**, 23-8.
- Gisselsson D. und Hoglund M. (2005) Connecting mitotic instability and chromosome aberrations in cancer--can telomeres bridge the gap? *Semin Cancer Biol*, **15**, 13-23.
- Gisselsson D., Jonson T., Petersen A., Strombeck B., Dal Cin P., Hoglund M., Mitelman F., Mertens F. und Mandahl N. (2001) Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12683-8.
- Gjoerup O. V., Wu J., Chandler-Militello D., Williams G. L., Zhao J., Schaffhausen B., Jat P. S. und Roberts T. M. (2007) Surveillance mechanism linking Bub1 loss to the p53 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 8334-9.

- Goldstein S., Littlefield J. W. und Soeldner J. S. (1969) Diabetes mellitus and aging: diminished plating efficiency of cultured human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**, 155-60.
- Goodhead D. T. (1989) The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol*, **56**, 623-34.
- Goodhead D. T., Thacker J. und Cox R. (1993) Weiss Lecture. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. *Int J Radiat Biol*, **63**, 543-56.
- Gotoh E. und Durante M. (2006) Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol*, **209**, 297-304.
- Gotoh E., Kawata T. und Durante M. (1999) Chromatid break rejoining and exchange aberration formation following gamma-ray exposure: analysis in G2 human fibroblasts by chemically induced premature chromosome condensation. *Int J Radiat Biol*, **75**, 1129-35.
- Greider C. W. (1994) Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation shortening and stabilization. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 203-11.
- Greider C. W. und Blackburn E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, **43**, 405-13.
- Griffin C. S., Marsden S. J., Stevens D. L., Simpson P. und Savage J. R. (1995) Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by <sup>238</sup>Pu alpha-particles and detected by fluorescence in situ hybridization using single chromosome-specific probes. *Int J Radiat Biol*, **67**, 431-9.
- Grososky A. J., Parks K. K., Giver C. R. und Nelson S. L. (1996) Clonal analysis of delayed karyotypic abnormalities and gene mutations in radiation-induced genetic instability. *Mol Cell Biol*, **16**, 6252-62.
- Guidotti J. E., Bregerie O., Robert A., Debey P., Brechot C. und Desdouets C. (2003) Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, **278**, 19095-101.
- Guidotti J. E., Mallet V. O., Mitchell C., Fabre M., Schoevaert D., Opolon P., Parlier D., Lambert M., Kahn A. und Gilgenkrantz H. (2001) Selection of in vivo retrovirally transduced hepatocytes leads to efficient and predictable mouse liver repopulation. *FASEB J*, **15**, 1849-51.
- Haberer T., Becher W., Schardt D. und Kraft G. (1993) Magnetic scanning system for heavy ion therapy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, **330**, 10.
- Hackett J. A., Feldser D. M. und Greider C. W. (2001) Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell*, **106**, 275-86.
- Hagstrom S. A. und Dryja T. P. (1999) Mitotic recombination map of 13cen-13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2952-7.
- Hall E. J. (1994) *Radiobiology for the radiobiologist*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Hall E. J. und Giaccia A. (2006) *Radiobiology for the Radiologist*, 6 edn.: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Halliwell B. (2003) Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett*, **540**, 3-6.
- Halliwell B. und Gutteridge J. (2007) *Free Radical in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Halliwell B. und Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*, **142**, 231-55.
- Han J. H., Roh M. S., Park C. H., Park K. C., Cho K. H., Kim K. H., Eun H. C. und Chung J. H. (2004) Selective COX-2 inhibitor, NS-398, inhibits the replicative senescence of cultured dermal fibroblasts. *Mech Ageing Dev*, **125**, 359-66.
- Hara E., Smith R., Parry D., Tahara H., Stone S. und Peters G. (1996) Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, **16**, 859-67.

- Harley C. B., Futcher A. B. und Greider C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-60.
- Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, **11**, 298-300.
- Harnden D. G., Benn P. A., Oxford J. M., Taylor A. M. und Webb T. P. (1976) Cytogenetically marked clones in human fibroblasts cultured from normal subjects. *Somatic Cell Genet*, **2**, 55-62.
- Hassold T., Hall H. und Hunt P. (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*, **16 Spec No. 2**, R203-8.
- Hastie N. D. und Allshire R. C. (1989) Human telomeres: fusion and interstitial sites. *Trends Genet*, **5**, 326-31.
- Hastings P. J., Ira G. und Lupski J. R. (2009) A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet*, **5**, e1000327.
- Hayflick L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, **37**, 614-36.
- Hayflick L. und Moorhead P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, **25**, 585-621.
- Heiss M., Fischer B. E., Jakob B., Fournier C., Becker G. und Taucher-Scholz G. (2006) Targeted irradiation of Mammalian cells using a heavy-ion microprobe. *Radiation Research*, **165**, 231-9.
- Heng H. H., Bremer S. W., Stevens J., Ye K. J., Miller F., Liu G. und Ye C. J. (2006a) Cancer progression by non-clonal chromosome aberrations. *J Cell Biochem*, **98**, 1424-35.
- Heng H. H., Liu G., Bremer S., Ye K. J., Stevens J. und Ye C. J. (2006b) Clonal and non-clonal chromosome aberrations and genome variation and aberration. *Genome*, **49**, 195-204.
- Herskind C., Bentzen S. M., Overgaard J., Overgaard M., Bamberg M. und Rodemann H. P. (1998) Differentiation state of skin fibroblast cultures versus risk of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Radiother Oncol*, **47**, 263-9.
- Herskind C. und Rodemann H. P. (2000) Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. *Exp Gerontol*, **35**, 747-55.
- Hille A., Hofman-Huther H., Kuhnle E., Wilken B., Rave-Frank M., Schmidberger H. und Virsik P. (2010) Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients. *Radiat Environ Biophys*, **49**, 27-37.
- Hoehn H. und Salk D. (1984) Clonal analysis of stable chromosome rearrangements in Bloom's syndrome fibroblasts. *Cancer Genet Cytogenet*, **11**, 405-15.
- Hoffschir F., Ricoul M., Lemieux N., Estrade S., Cassingena R. und Dutrillaux B. (1992) Jumping translocations originate clonal rearrangements in SV40-transformed human fibroblasts. *Int J Cancer*, **52**, 130-6.
- Hornsby P. J. (2002) Cellular senescence and tissue aging in vivo. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **57**, B251-6.
- Houben J. M., Moonen H. J., van Schooten F. J. und Hageman G. J. (2008) Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med*, **44**, 235-46.
- Huffman K. E., Levene S. D., Tesmer V. M., Shay J. W. und Wright W. E. (2000) Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem*, **275**, 19719-22.
- Ichijima Y., Yoshioka K., Yoshioka Y., Shinohe K., Fujimori H., Unno J., Takagi M., Goto H., Inagaki M., Mizutani S. und Teraoka H. (2010) DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS One*, **5**, e8821.
- ICRU-Report (1998) Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation / International Commition on Radiation Units and Measurements (ICRU). . **Nr. 60**.
- Iliakis G., Wang H., Perrault A. R., Boecker W., Rosidi B., Windhofer F., Wu W., Guan J., Terzoudi G. und Pantelias G. (2004) Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet. Genome Res.*, **104**, 14-20.

- Johnson K. L., Brenner D. J., Geard C. R., Nath J. und Tucker J. D. (1999) Chromosome aberrations of clonal origin in irradiated and unexposed individuals: assessment and implications. *Radiation Research*, **152**, 1-5.
- Kadhim M. A. (2003) Role of genetic background in induced instability. *Oncogene*, **22**, 6994-9.
- Kadhim M. A., Lorimore S. A., Hepburn M. D., Goodhead D. T., Buckle V. J. und Wright E. G. (1994) Alpha-particle-induced chromosomal instability in human bone marrow cells. *Lancet*, **344**, 987-8.
- Kadhim M. A., Macdonald D. A., Goodhead D. T., Lorimore S. A., Marsden S. J. und Wright E. G. (1992) Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation. *Nature*, **355**, 738-40.
- Kadhim M. A., Marsden S. J. und Wright E. G. (1998) Radiation-induced chromosomal instability in human fibroblasts: temporal effects and the influence of radiation quality. *Int J Radiat Biol*, **73**, 143-8.
- Katinka M. D. und Bourgain F. M. (1992) Interstitial telomeres are hotspots for illegitimate recombination with DNA molecules injected into the macronucleus of *Paramecium primaurelia*. *EMBO J*, **11**, 725-32.
- Kehrer-Sawatzki H., Rock H., Gotz H., Siegel A. und Krone W. (1999) Monosomy 6 in human cultured fibroblast-like cells permanently stimulated by fibroblast growth factor 1: evidence for selection. *Cytogenet. Cell Genet.*, **86**, 28-33.
- Kesler S. R. (2007) Turner syndrome. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, **16**, 709-22.
- Kim G. J., Chandrasekaran K. und Morgan W. F. (2006) Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review. *Mutagenesis*, **21**, 361-7.
- Kim W. Y. und Sharpless N. E. (2006) The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, **127**, 265-75.
- Kimura M., Cao X., Patel S. und Aviv A. (2004) Survival advantage of cultured human vascular endothelial cells that lost chromosome 13. *Chromosoma*, **112**, 317-22.
- Klimova T. A., Bell E. L., Shroff E. H., Weinberg F. D., Snyder C. M., Dimri G. P., Schumacker P. T., Budinger G. R. und Chandel N. S. (2009) Hyperoxia-induced premature senescence requires p53 and pRb, but not mitochondrial matrix ROS. *FASEB J*, **23**, 783-94.
- Knuutila S., Aalto Y., Autio K., Bjorkqvist A. M., El-Rifai W., Hemmer S., Huhta T., Kettunen E., Kiuru-Kuhlefelt S., Larramendy M. L., Lushnikova T., Monni O., Pere H., Tapper J., Tarkkanen M., Varis A., Wasenius V. M., Wolf M. und Zhu Y. (1999) DNA copy number losses in human neoplasms. *Am.J.Pathol.*, **155**, 683-94.
- Kodama Y., Ohtaki K., Nakano M., Hamasaki K., Awa A. A., Lagarde F. und Nakamura N. (2005) Clonally expanded T-cell populations in atomic bomb survivors do not show excess levels of chromosome instability. *Radiation Research*, **164**, 618-26.
- Kraft G., Daues H. W., Fischer B., Kopf U., Liebold H. P., Quis D., Stelzer H., Kiefer J., Schpfer F., Schneider E., Weber K., Wulf H. und Dertinger H. (1980) Irradiation chamber and sample changer for biological samples. *Nuclear instruments and methods*, **168**, 175-79.
- Kraft G., Kramer M. und Scholz M. (1992) LET, track structure and models. A review. *Radiat Environ Biophys*, **31**, 161-80.
- Kramer M. und Kraft G. (1994) Track structure and DNA damage. *Adv Space Res*, **14**, 151-9.
- Kramer M. und Scholz M. (2006) Rapid calculation of biological effects in ion radiotherapy. *Phys Med Biol*, **51**, 1959-70.
- Kreth G., Pazhanisamy S. K., Hausmann M. und Cremer C. (2007) Cell type-specific quantitative predictions of radiation-induced chromosome aberrations: a computer model approach. *Radiation Research*, **167**, 515-25.
- Krone W., Kehrer-Sawatzki H., Siegel A., Rock H. und Gotz H. (1997) Monosomy 6 in human cultured fibroblast-like cells after long-term stimulation with acidic fibroblast growth factor (FGF1). *Cytogenet. Cell Genet.*, **78**, 96-102.

- Laderman K. A., Penny J. R., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarlato G. und Attardi G. (1996) Aging-dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts transferred into mtDNA-less cells. *J Biol Chem*, **271**, 15891-7.
- Lander H. M. (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*, **11**, 118-24.
- Latil A., Morant P., Fournier G., Mangin P., Berthon P. und Cussenot O. (2002) CHC1-L, a candidate gene for prostate carcinogenesis at 13q14.2, is frequently affected by loss of heterozygosity and underexpressed in human prostate cancer. *Int J Cancer*, **99**, 689-96.
- Lawrence A., Jones C. M., Wardman P. und Burkitt M. J. (2003) Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Implications for oxidative stress during apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 29410-9.
- Lazar A., Abruzzo L. V., Pollock R. E., Lee S. und Czerniak B. (2006) Molecular diagnosis of sarcomas: chromosomal translocations in sarcomas. *Arch Pathol Lab Med*, **130**, 1199-207.
- Leach J. K., Van Tuyle G., Lin P. S., Schmidt-Ullrich R. und Mikkelsen R. B. (2001) Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res*, **61**, 3894-901.
- Li X. und Heyer W. D. (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*, **18**, 99-113.
- Limoli C. L., Giedzinski E., Morgan W. F., Swarts S. G., Jones G. D. und Hyun W. (2003) Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res*, **63**, 3107-11.
- Limoli C. L., Hartmann A., Shephard L., Yang C. R., Boothman D. A., Bartholomew J. und Morgan W. F. (1998) Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity. *Cancer Res*, **58**, 3712-8.
- Limoli C. L., Kaplan M. I., Corcoran J., Meyers M., Boothman D. A. und Morgan W. F. (1997) Chromosomal instability and its relationship to other end points of genomic instability. *Cancer Res*, **57**, 5557-63.
- Lin A. W., Barradas M., Stone J. C., van Aelst L., Serrano M. und Lowe S. W. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*, **12**, 3008-19.
- Liskay R. M., Letsou A. und Stachelek J. L. (1987) Homology requirement for efficient gene conversion between duplicated chromosomal sequences in mammalian cells. *Genetics*, **115**, 161-7.
- Little J. B. (1994) Failla Memorial Lecture. Changing views of cellular radiosensitivity. *Radiat Res*, **140**, 299-311.
- Little J. B. (1998) Radiation-induced genomic instability. *Int J Radiat Biol*, **74**, 663-71.
- Little J. B. (2000) Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21**, 397-404.
- Littlefield L. G. und Mailhes J. B. (1975) Comparison of chromosome breakages in lymphocytes and fibroblasts from control women and women taking oral contraceptives. *Fertil Steril*, **26**, 828-32.
- Llorente B., Smith C. E. und Symington L. S. (2008) Break-induced replication: what is it and what is it for? *Cell Cycle*, **7**, 859-64.
- Lo A. W., Sabatier L., Fouladi B., Pottier G., Ricoul M. und Murnane J. P. (2002a) DNA amplification by breakage/fusion/bridge cycles initiated by spontaneous telomere loss in a human cancer cell line. *Neoplasia*, **4**, 531-8.
- Lo A. W., Sprung C. N., Fouladi B., Pedram M., Sabatier L., Ricoul M., Reynolds G. E. und Murnane J. P. (2002b) Chromosome instability as a result of double-strand breaks near telomeres in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 4836-50.
- Lorenz M., Saretzki G., Sitte N., Metzkow S. und von Zglinicki T. (2001) BJ fibroblasts display high antioxidant capacity and slow telomere shortening independent of hTERT transfection. *Free Radic Biol Med*, **31**, 824-31.
- Loucas B. D. und Cornforth M. N. (2001) Complex chromosome exchanges induced by gamma rays in human lymphocytes: an mFISH study. *Radiat Res*, **155**, 660-71.

- Loucas B. D., Eberle R., Bailey S. M. und Cornforth M. N. (2004) Influence of dose rate on the induction of simple and complex chromosome exchanges by gamma rays. *Radiat Res*, **162**, 339-49.
- Lu T. und Finkel T. (2008) Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*, **314**, 1918-22.
- Lucibello F. C., Sewing A., Brusselbach S., Burger C. und Muller R. (1993) Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts. *J Cell Sci*, **105 (Pt 1)**, 123-33.
- Ly D. H., Lockhart D. J., Lerner R. A. und Schultz P. G. (2000) Mitotic misregulation and human aging. *Science*, **287**, 2486-92.
- Maarek O., Jonveaux P., Le Coniat M., Derre J. und Berger R. (1996) Faconi anemia and bone marrow clonal chromosome abnormalities. *Leukemia*, **10**, 1700-4.
- Mahale A. M., Khan Z. A., Igarashi M., Nanjangud G. J., Qiao R. F., Yao S., Lee S. W. und Aaronson S. A. (2008) Clonal selection in malignant transformation of human fibroblasts transduced with defined cellular oncogenes. *Cancer Res*, **68**, 1417-26.
- Marder B. A. und Morgan W. F. (1993) Delayed chromosomal instability induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*, **13**, 6667-77.
- Martin G. M., Sprague C. A., Norwood T. H. und Pendergrass W. R. (1974) Clonal selection, attenuation and differentiation in an in vitro model of hyperplasia. *Am J Pathol*, **74**, 137-54.
- Martins M. B., Sabatier L., Ricoul M., Gerbault-Seureau M. und Dutrillaux B. (1994) Clonal rearrangements in human irradiated fibroblasts. *Mutat Res*, **308**, 169-75.
- Martins M. B., Sabatier L., Ricoul M., Pinton A. und Dutrillaux B. (1993) Specific chromosome instability induced by heavy ions: a step towards transformation of human fibroblasts? *Mutat Res*, **285**, 229-37.
- McCarron M., Osborne Y., Story C. J., Dempsey J. L., Turner D. R. und Morley A. A. (1987) Effect of age on lymphocyte proliferation. *Mech Ageing Dev*, **41**, 211-8.
- McClintock B. (1941) The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics*, **26**, 234-82.
- Meltzer P. S., Guan X. Y. und Trent J. M. (1993) Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nat Genet*, **4**, 252-5.
- Merz G. S., Jr. und Ross J. D. (1973) Clone size variation in the human diploid cell strain, WI-38. *J Cell Physiol*, **82**, 75-80.
- Meyne J., Baker R. J., Hobart H. H., Hsu T. C., Ryder O. A., Ward O. G., Wiley J. E., Wurster-Hill D. H., Yates T. L. und Moyzis R. K. (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, **99**, 3-10.
- Mitelman F., Johansson B. und Mertens F. (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*, **7**, 233-45.
- Mondello C., Pirzio L., Azzalin C. M. und Giulotto E. (2000) Instability of interstitial telomeric sequences in the human genome. *Genomics*, **68**, 111-7.
- Morales C. P., Holt S. E., Ouellette M., Kaur K. J., Yan Y., Wilson K. S., White M. A., Wright W. E. und Shay J. W. (1999) Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet*, **21**, 115-8.
- Morgan T. L., Yang D. J., Fry D. G., Hurlin P. J., Kohler S. K., Maher V. M. und McCormick J. J. (1991) Characteristics of an infinite life span diploid human fibroblast cell strain and a near-diploid strain arising from a clone of cells expressing a transfected v-myc oncogene. *Exp Cell Res*, **197**, 125-36.
- Morgan W. F. (2003) Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene*, **22**, 7094-9.
- Morton N. E. (1991) Parameters of the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 7474-6.
- Mothersill C. und Seymour C. B. (1998) Mechanisms and implications of genomic instability and other delayed effects of ionizing radiation exposure. *Mutagenesis*, **13**, 421-6.
- Mullins J. M. und Biesele J. J. (1977) Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol*, **73**, 672-84.



- Munro T. R. (1970) The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res*, **42**, 451-70.
- Murnane J. P. (2006a) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1082-92.
- Murnane J. P. (2006b) Telomeres and chromosome instability. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1082-92.
- Murnane J. P. und Sabatier L. (2004) Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer. *Bioessays*, **26**, 1164-74.
- Musio A., Montagna C., Zambroni D., Indino E., Barbieri O., Citti L., Villa A., Ried T. und Vezzoni P. (2003) Inhibition of BUB1 results in genomic instability and anchorage-independent growth of normal human fibroblasts. *Cancer Res*, **63**, 2855-63.
- Nasonova E., Fussel K., Berger S., Gudowska-Nowak E. und Ritter S. (2004) Cell cycle arrest and aberration yield in normal human fibroblasts. I. Effects of X-rays and 195 MeV u(-1) C ions. *Int J Radiat Biol*, **80**, 621-34.
- Neeley W. L. und Essigmann J. M. (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol*, **19**, 491-505.
- Nishio K., Inoue A., Qiao S., Kondo H. und Mimura A. (2001) Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochem Cell Biol*, **116**, 321-7.
- Noda A., Ning Y., Venable S. F., Pereira-Smith O. M. und Smith J. R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*, **211**, 90-8.
- Norppa H. und Falck G. C. (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, **18**, 221-33.
- Obe G. und Müller W. U. (1999) *Zytogenetik in der genetischen Toxikologie und Strahlenbiologie*, 3 edn.
- Ogryzko V. V., Hirai T. H., Russanova V. R., Barbie D. A. und Howard B. H. (1996) Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol*, **16**, 5210-8.
- Ohashi T., Mizutani A., Murakami A., Kojo S., Ishii T. und Taketani S. (2002) Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett*, **511**, 21-7.
- Oikawa S. und Kawanishi S. (1999) Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett*, **453**, 365-8.
- Olovnikov A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*, **41**, 181-90.
- Orrenius S., Gogvadze V. und Zhivotovsky B. (2007) Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **47**.
- Ostashevsky J. Y. (2000) Higher-order structure of interphase chromosomes and radiation-induced chromosomal exchange aberrations. *Int J Radiat Biol*, **76**, 1179-87.
- Ouellette M. M., Aisner D. L., Savre-Train I., Wright W. E. und Shay J. W. (1999) Telomerase activity does not always imply telomere maintenance. *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 795-803.
- Pampalona J., Soler D., Genesca A. und Tusell L. (2010) Whole chromosome loss is promoted by telomere dysfunction in primary cells. *Genes Chromosomes Cancer*, **49**, 368-78.
- Pampfer S. und Streffer C. (1989) Increased chromosome aberration levels in cells from mouse fetuses after zygote X-irradiation. *Int J Radiat Biol*, **55**, 85-92.
- Parrinello S., Coppe J. P., Krtolica A. und Campisi J. (2005) Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*, **118**, 485-96.
- Passos J. F., Saretzki G., Ahmed S., Nelson G., Richter T., Peters H., Wappler I., Birket M. J., Harold G., Schaeuble K., Birch-Machin M. A., Kirkwood T. B. und von Zglinicki T. (2007) Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol*, **5**, e110.

- Pastwa E., Neumann R. D., Mezhevaya K. und Winters T. A. (2003) Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. *Radiat Res*, **159**, 251-61.
- Payne S. R. und Kemp C. J. (2005) Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis*, **26**, 2031-45.
- Pendergrass W. R., Gray M., Wold M. S., Luo P. und Norwood T. H. (1999) Analysis of the capacity of extracts from normal human young and senescent fibroblasts to support DNA synthesis in vitro. *J Cell Biochem*, **73**, 176-87.
- Perner S., Bruderlein S., Hasel C., Waibel I., Holdenried A., Ciloglu N., Chopurian H., Nielsen K. V., Plesch A., Hogel J. und Moller P. (2003) Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *Am J Pathol*, **163**, 1751-6.
- Petersen S., Saretzki G. und von Zglinicki T. (1998) Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res*, **239**.
- Pinto M., Prise K. M. und Michael B. D. (2005) Evidence for complexity at the nanometer scale of radiation-induced DNA DSBs as a determinant of rejoining kinetics. *Radiat Res*, **164**, 73-85.
- Poiley J. A., Schuman R. F. und Pienta R. J. (1978) Characterization of normal human embryo cells grown to over 100 population doublings. *In Vitro*, **14**, 405-12.
- Pollack J. R., Sorlie T., Perou C. M., Rees C. A., Jeffrey S. S., Lonning P. E., Tibshirani R., Botstein D., Borresen-Dale A. L. und Brown P. O. (2002) Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12963-8.
- Polyak K., Kato J. Y., Solomon M. J., Sherr C. J., Massague J., Roberts J. M. und Koff A. (1994) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, **8**, 9-22.
- Ponnaiya B., Cornforth M. N. und Ullrich R. L. (1997a) Induction of chromosomal instability in human mammary cells by neutrons and gamma rays. *Radiat Res*, **147**, 288-94.
- Ponnaiya B., Cornforth M. N. und Ullrich R. L. (1997b) Radiation-induced chromosomal instability in BALB/c and C57BL/6 mice: the difference is as clear as black and white. *Radiat Res*, **147**, 121-5.
- Pories W. J., Murinson D. S. und Rubin P. (1983) Soft Tissue Sarcoma. *Clinical Oncology*, **16**.
- Prise K. M., Ahnstrom G., Belli M., Carlsson J., Frankenberg D., Kiefer J., Lobrich M., Michael B. D., Nygren J., Simone G. und Stenerlow B. (1998) A review of dsb induction data for varying quality radiations. *Int J Radiat Biol*, **74**, 173-84.
- Prise K. M., Folkard M., Newman H. C. und Michael B. D. (1994) Effect of radiation quality on lesion complexity in cellular DNA. *Int J Radiat Biol*, **66**, 537-42.
- Prise K. M., Pinto M., Newman H. C. und Michael B. D. (2001) A review of studies of ionizing radiation-induced double-strand break clustering. *Radiat Res*, **156**, 572-6.
- Prithivirajsingh S., Story M. D., Bergh S. A., Geara F. B., Ang K. K., Ismail S. M., Stevens C. W., Buchholz T. A. und Brock W. A. (2004) Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett*, **571**, 227-32.
- Prives C. und Gottifredi V. (2008) The p21 and PCNA partnership: a new twist for an old plot. *Cell Cycle*, **7**, 3840-6.
- Puck T. T. und Marcus P. I. (1955) A rapid method for viable cell tritiation and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **41**, 432-7.
- Rabbitts T. H. (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, **372**, 143-9.
- Rabinovitch P. S. (1983) Regulation of human fibroblast growth rate by both noncycling cell fraction transition probability is shown by growth in 5-bromodeoxyuridine followed by Hoechst 33258 flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 2951-5.
- Rajewsky B. (1952) The limits of the target theory of the biological action of radiation. *Br J Radiol*, **25**, 550-2.

- Ramirez R. D., Morales C. P., Herbert B. S., Rohde J. M., Passons C., Shay J. W. und Wright W. E. (2001) Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev*, **15**, 398-403.
- Ramsey M. R. und Sharpless N. E. (2006) ROS as a tumour suppressor? *Nat Cell Biol*, **8**, 1213-5.
- Rangarajan A. und Weinberg R. A. (2003) Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat.Rev.Cancer*, **3**, 952-9.
- Redpath J. L. und Gutierrez M. (2001) Kinetics of induction of reactive oxygen species during the post-irradiation expression of neoplastic transformation in vitro. *Int J Radiat Biol*, **77**, 1081-5.
- Rieder H., Bonwetsch C., Janssen L. A., Maurer J., Janssen J. W., Schwartz S., Ludwig W. D., Gassmann W., Bartram C. R., Thiel E., Löffler H., Gokbuget N., Hoelzer D. und Fonatsch C. (1998) High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **12**, 1473-81.
- Robinson K. M., Janes M. S., Pehar M., Monette J. S., Ross M. F., Hagen T. M., Murphy M. P. und Beckman J. S. (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *PNAS*, **103**.
- Robles S. J. und Adami G. R. (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, **16**, 1113-23.
- Rodemann H. P. (1989) Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro. *Differentiation*, **42**, 37-43.
- Rodemann H. P. und Muller G. A. (1991) Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis*, **17**, 684-6.
- Rodemann H. P., Peterson H. P., Schwenke K. und von Wangenheim K. H. (1991) Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc*, **5**, 1135-42; discussion 42-3.
- Rota C., Fann Y. C. und Mason R. P. (1999) Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. *J Biol Chem*, **274**, 28161-8.
- Royle N. J., Foxon J., Jeyapalan J. N., Mendez-Bermudez A., Novo C. L., Williams J. und Cotton V. E. (2008) Telomere length maintenance--an ALTerNative mechanism. *Cytogenet Genome Res*, **122**, 281-91.
- Rubelj I. und Pereira-Smith O. M. (1994) SV40-transformed human cells in crisis exhibit changes that occur in normal cellular senescence. *Exp Cell Res*, **211**, 82-9.
- Rubin H. (1997) Cell aging in vivo and in vitro. *Mech Ageing Dev*, **98**, 1-35.
- Rubin H. (2002) Promise and problems in relating cellular senescence in vitro to aging in vivo. *Arch Gerontol Geriatr*, **34**, 275-86.
- Rugo R. E. und Schiestl R. H. (2004) Increases in oxidative stress in the progeny of X-irradiated cells. *Radiat Res*, **162**, 416-25.
- Rugo R. E., Secretan M. B. und Schiestl R. H. (2002) X radiation causes a persistent induction of reactive oxygen species and a delayed reinduction of TP53 in normal human diploid fibroblasts. *Radiat Res*, **158**, 210-9.
- Ruiz-Herrera A., Nergadze S. G., Santagostino M. und Giulotto E. (2008) Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenet Genome Res*, **122**, 219-28.
- Sabatier L., Ricoul M., Pottier G. und Murnane J. P. (2005) The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Mol.Cancer Res.*, **3**, 139-50.
- Saito H., Hammond A. T. und Moses R. E. (1995) The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Exp Cell Res*, **217**, 272-9.

- Saksela E. und Moorhead P. S. (1963) Aneuploidy in the Degenerative Phase of Serial Cultivation of Human Cell Strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **50**, 390-5.
- Salomaa S., Holmberg K., Lindholm C., Mustonen R., Tekkel M., Veidebaum T. und Lambert B. (1998) Chromosomal instability in in vivo radiation exposed subjects. *Int J Radiat Biol*, **74**, 771-9.
- Santarosa M. und Ashworth A. (2004) Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta*, **1654**, 105-22.
- Saracoglu K., Brown J., Kearney L., Uhrig S., Azofeifa J., Fauth C., Speicher M. R. und Eils R. (2001) New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, **44**, 7-15.
- Saretzki G., Feng J., von Zglinicki T. und Villeponteau B. (1998) Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **53**, B438-42.
- Saretzki G., Murphy M. P. und von Zglinicki T. (2003) MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell*, **2**, 141-3.
- Savage J. R. (1976) Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet*, **13**, 103-22.
- Savage J. R. und Simpson P. J. (1994) FISH "painting" patterns resulting from complex exchanges. *Mutat Res*, **312**, 51-60.
- Sax J. K. und El-Deiry W. S. (2003) p53 downstream targets and chemosensitivity. *Cell Death Differ*, **10**, 413-7.
- Scappaticci S., Cerimele D. und Fraccaro M. (1982) Clonal structural chromosomal rearrangements in primary fibroblast cultures and in lymphocytes of patients with Werner's Syndrome. *Hum Genet*, **62**, 16-24.
- Scholz M. (2003) Effects of ion radiation on cells and tissues. *Advances in polymer science*, **162**, 58.
- Scholz M., Kellerer A. M., Kraft-Weyrather W. und Kraft G. (1997) Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy. The model and its approximation. *Radiat Environ Biophys*, **36**, 59-66.
- Scholz M., Kraft-Weyrather W., Ritter S. und Kraft G. (1994) Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells. *Int J Radiat Biol*, **66**, 59-75.
- Schwarze P. E., Pettersen E. O., Shoaib M. C. und Seglen P. O. (1984) Emergence of a population of small, diploid hepatocytes during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **5**, 1267-75.
- Serra V., von Zglinicki T., Lorenz M. und Saretzki G. (2003) Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J Biol Chem*, **278**, 6824-30.
- Serrano M. und Blasco M. A. (2001) Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 748-53.
- Serrano M., Hannon G. J. und Beach D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**, 704-7.
- Sharpless N. E., Ferguson D. O., O'Hagan R. C., Castrillon D. H., Lee C., Farazi P. A., Alson S., Fleming J., Morton C. C., Frank K., Chin L., Alt F. W. und DePinho R. A. (2001) Impaired nonhomologous end-joining provokes soft tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. *Mol Cell*, **8**, 1187-96.
- Shay J. W., Pereira-Smith O. M. und Wright W. E. (1991) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res*, **196**, 33-9.
- Shay J. W., Van Der Haegen B. A., Ying Y. und Wright W. E. (1993) The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res.*, **209**, 45-52.
- Shay J. W. und Wright W. E. (1989) Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp Cell Res*, **184**, 109-18.
- Shelton D. N., Chang E., Whittier P. S., Choi D. und Funk W. D. (1999) Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.*, **9**, 939-45.
- Sherr C. J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-7.

- Sherr C. J. und DePinho R. A. (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, **102**, 407-10.
- Sherr C. J. und Roberts J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-12.
- Sherwood S. W., Rush D., Ellsworth J. L. und Schimke R. T. (1988) Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **85**, 9086-90.
- Shi Q. und King R. W. (2005) Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*, **437**, 1038-42.
- Smith J. R. und Hayflick L. (1974) Variation in the life-span of clones derived from human diploid cell strains. *J Cell Biol*, **62**, 48-53.
- Smith J. R. und Whitney R. G. (1980) Intracloal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. *Science*, **207**, 82-4.
- Smith L. E., Nagar S., Kim G. J. und Morgan W. F. (2003) Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response. *Health Phys*, **85**, 23-9.
- Smogorzewska A. und de Lange T. (2002) Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J*, **21**, 4338-48.
- Soler D., Genesca A., Arnedo G., Egozcue J. und Tusell L. (2005) Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer*, **44**, 339-50.
- Stein G. H., Drullinger L. F., Soulard A. und Dulic V. (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 2109-17.
- Stewenius Y., Gorunova L., Jonson T., Larsson N., Hoglund M., Mandahl N., Mertens F., Mitelman F. und Gisselsson D. (2005) Structural and numerical chromosome changes in colon cancer develop through telomere-mediated anaphase bridges, not through mitotic multipolarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5541-6.
- Strachan T. und Read A. P. (2005) *Molekulare Humangenetik*. Elsevier GmbH München.
- Sudo H., Garbe J., Stampfer M. R., Barcellos-Hoff M. H. und Kronenberg A. (2008) Karyotypic instability and centrosome aberrations in the progeny of finite life-span human mammary epithelial cells exposed to sparsely or densely ionizing radiation. *Radiation Research*, **170**, 23-32.
- Suzuki K., Mori I., Nakayama Y., Miyakoda M., Kodama S. und Watanabe M. (2001) Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat Res*, **155**, 248-53.
- Suzuki K., Ojima M., Kodama S. und Watanabe M. (2003) Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. *Oncogene*, **22**, 6988-93.
- Tahara H., Sato E., Noda A. und Ide T. (1995) Increase in expression level of p21sdi1/cip1/waf1 with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Oncogene*, **10**, 835-40.
- Takai H., Smogorzewska A. und de Lange T. (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol*, **13**, 1549-56.
- Takeuchi M., Takeuchi K., Ozawa Y., Kohara A. und Mizusawa H. (2009) Aneuploidy in immortalized human mesenchymal stem cells with non-random loss of chromosome 13 in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **45**, 290-9.
- Talmadge J. E. (2007) Clonal selection of metastasis within the life history of a tumor. *Cancer Res*, **67**, 11471-5.
- Tamm I., Kikuchi T., Wang E. und Pfeffer L. M. (1984) Growth rate of control and beta-interferon-treated human fibroblast populations over the course of their in vitro life span. *Cancer Res*, **44**, 2291-6.
- Tampo Y., Kotamraju S., Chitambar C. R., Kalivendi S. V., Keszler A., Joseph J. und Kalyanaraman B. (2003) Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells: role of transferrin receptor-dependent iron uptake in apoptosis. *Circ Res*, **92**, 56-63.

- Tawn E. J., Whitehouse C. A., Holdsworth D., De Ruyck K., Vandenbulcke K. und Thierens H. (2008) mBAND analysis of chromosome aberrations in lymphocytes exposed in vitro to alpha-particles and gamma-rays. *Int J Radiat Biol*, **84**, 447-53.
- Tawn E. J., Whitehouse C. A., Winther J. F., Curwen G. B., Rees G. S., Stovall M., Olsen J. H., Guldberg P., Rechnitzer C., Schroder H. und Boice J. D., Jr. (2005) Chromosome analysis in childhood cancer survivors and their offspring--no evidence for radiotherapy-induced persistent genomic instability. *Mutat Res*, **583**, 198-206.
- Teixeira M. R., Qvist H., Bohler P. J., Pandis N. und Heim S. (1998) Cytogenetic analysis shows that carcinosarcomas of the breast are of monoclonal origin. *Genes Chromosomes Cancer*, **22**, 145-51.
- Tenhumberg S., Gudowska-Nowak E., Nasonova E. und Ritter S. (2007) Cell cycle arrest and aberration yield in normal human fibroblasts. II: Effects of 11 MeV u-1 C ions and 9.9 MeV u-1 Ni ions. *Int.J.Radiat.Biol.*, **83**, 501-13.
- Testard I., Dutrillaux B. und Sabatier L. (1997) Chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by high-LET irradiation. *Int J Radiat Biol*, **72**, 423-33.
- Thompson K. V. und Holliday R. (1975) Chromosome changes during the in vitro ageing of MRC-5 human fibroblasts. *Exp Cell Res*, **96**, 1-6.
- Thompson K. V. und Holliday R. (1978) The longevity of diploid and polyploid human fibroblasts. Evidence against the somatic mutation theory of cellular ageing. *Exp Cell Res*, **112**, 281-7.
- Thompson S. L. und Compton D. A. (2010) Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol*, **188**, 369-81.
- Toen B. M. (2003) The Biology of Aging. *The mount sinai journal of medicine*, **70**, 20.
- Tominaga H., Kodama S., Matsuda N., Suzuki K. und Watanabe M. (2004) Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *J Radiat Res (Tokyo)*, **45**, 181-8.
- Tonnies H., Huber S., Kuhl J. S., Gerlach A., Ebell W. und Neitzel H. (2003) Clonal chromosomal aberrations in bone marrow cells of Fanconi anemia patients: gains of the chromosomal segment 3q26q29 as an adverse risk factor. *Blood*, **101**, 3872-4.
- Toussaint O., Dumont P., Dierick J. F., Pascal T., Fripiat C., Chainiaux F., Sluse F., Eliaers F. und Remacle J. (2000a) Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Ann N Y Acad Sci*, **908**, 85-98.
- Toussaint O., Medrano E. E. und von Zglinicki T. (2000b) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, **35**, 927-45.
- Tsafirir D., Bacolod M., Selvanayagam Z., Tsafirir I., Shia J., Zeng Z., Liu H., Krier C., Stengel R. F., Barany F., Gerald W. L., Paty P. B., Domany E. und Notterman D. A. (2006) Relationship of gene expression and chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Cancer Res*, **66**, 2129-37.
- Tsutsui T., Tanaka Y., Matsudo Y., Hasegawa K., Fujino T., Kodama S. und Barrett J. C. (1997) Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation. *Mol.Carcinog.*, **18**, 7-18.
- Tulard A., Hoffschir F., de Boisferon F. H., Luccioni C. und Bravard A. (2003) Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic Biol Med*, **35**, 68-77.
- Turrens J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, **552**, 335-44.
- Uetake Y. und Sluder G. (2004) Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *J Cell Biol*, **165**, 609-15.
- Uhlmann V., Prasad M., Silva I., Luettich K., Grande L., Alonso L., Thisted M., Pluzek K. J., Gorst J., Ring M., Sweeney M., Kenny C., Martin C., Russell J., Bermingham N., O'Donovan M., Sheils O. und O'Leary J. J. (2000) Improved in situ detection method for telomeric tandem repeats in metaphase spreads and interphase nuclei. *Mol Pathol*, **53**, 48-50.
- Ullrich R. L. und Davis C. M. (1999) Radiation-induced cytogenetic instability in vivo. *Radiat Res*, **152**, 170-3.

- Ullrich R. L. und Ponnaiya B. (1998) Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int J Radiat Biol*, **74**, 747-54.
- Upender M. B., Habermann J. K., McShane L. M., Korn E. L., Barrett J. C., Difilippantonio M. J. und Ried T. (2004) Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 6941-9.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C. J. und Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, **266**, 37-56.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. und Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **39**, 44-84.
- Vaziri H. und Benchimol S. (1996) From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp.Gerontol.*, **31**, 295-301.
- Vinnikov V. A., Maznyk N. A. und Lloyd D. (2010) Delayed chromosomal instability in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. *Int J Radiat Biol*, **86**, 271-82.
- von Zglinicki T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*, **27**, 339-44.
- von Zglinicki T. (2003) Replicative senescence and the art of counting. *Exp Gerontol*, **38**, 1259-64.
- von Zglinicki T., Saretzki G., Docke W. und Lotze C. (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res*, **220**, 186-93.
- Vracko R., McFarland B. H. und Pecoraro R. E. (1983) Seeding efficiency, plating efficiency, and population doublings of human skin fibroblastlike cells: results of replicate testing. *In Vitro*, **19**, 504-14.
- Waga S., Hannon G. J., Beach D. und Stillman B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, **369**, 574-8.
- Wagner M., Hampel B., Bernhard D., Hala M., Zwerschke W. und Jansen-Durr P. (2001) Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp.Gerontol.*, **36**, 1327-47.
- Wardman P. (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med*, **43**, 995-1022.
- Watson G. E., Lorimore S. A. und Wright E. G. (1996) Long-term in vivo transmission of alpha-particle-induced chromosomal instability in murine haemopoietic cells. *Int J Radiat Biol*, **69**, 175-82.
- Watson J. D. (1972) Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, **239**, 197-201.
- Weaver B. A., Silk A. D. und Cleveland D. W. (2006) Cell biology: nondisjunction, aneuploidy and tetraploidy. *Nature*, **442**, E9-10; discussion E.
- Weber B., Allen L., Magenis R. E., Goodfellow P. J., Smith L. und Hayden M. R. (1991) Intrachromosomal location of the telomeric repeat (TTAGGG)<sub>n</sub>. *Mamm Genome*, **1**, 211-6.
- Wei W., Herbig U., Wei S., Dutriaux A. und Sedivy J. M. (2003) Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts. *EMBO Rep.*, **4**, 1061-6.
- Wei W. und Sedivy J. M. (1999) Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp.Cell Res.*, **253**, 519-22.
- Weissenborn U. und Streffer C. (1988) Analysis of structural and numerical chromosomal anomalies at the first, second, and third mitosis after irradiation of one-cell mouse embryos with X-rays or neutrons. *Int J Radiat Biol*, **54**, 381-94.
- Whitehouse C. A. und Tawn E. J. (2001) No evidence for chromosomal instability in radiation workers with in vivo exposure to plutonium. *Radiat Res*, **156**, 467-75.
- Williams B. R., Prabhu V. R., Hunter K. E., Glazier C. M., Whittaker C. A., Housman D. E. und Amon A. (2008) Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. *Science*, **322**, 703-9.

- Winter M. (2007) Zelluläre und molekularbiologische Grundlagen der vorzeitigen Alterung humaner Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder Kohlenstoff-Ionen. Dissertation, TU Darmstadt.
- Wong C. und Stearns T. (2005) Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol*, **6**, 6.
- Wright E. G. (2010) Manifestations and mechanisms of non-targeted effects of ionizing radiation. *Mutat Res*, **687**, 28-33.
- Wright W. E. und Hayflick L. (1972) Formation of anucleate and multinucleate cells in normal and SV 40 transformed WI-38 by cytochalasin B. *Exp Cell Res*, **74**, 187-94.
- Wright W. E. und Shay J. W. (2001) Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 98-103.
- Wright W. E. und Shay J. W. (2002) Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol*, **20**, 682-8.
- Wu H., Durante M., Furusawa Y., George K., Kawata T. und Cucinotta F. A. (2003) M-FISH analysis of chromosome aberrations in human fibroblasts exposed to energetic iron ions in vitro. *Adv Space Res*, **31**, 1537-42.
- Xiong Y., Hannon G. J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R. und Beach D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**, 701-4.
- Zahnreich S. (2007) Spontane Chromosomenschäden und genetische Instabilität in Langzeitkulturen verschiedener humaner Fibroblastenlinien. Diplomarbeit, Hochschule Darmstadt.
- Zahnreich S., Melnikova L., Winter M., Nasonova E., Durante M., Ritter S. und Fournier C. (2010) Radiation-induced premature senescence is associated with specific cytogenetic changes. *Mutat Res*.
- Zhang F., Khajavi M., Connolly A. M., Towne C. F., Batish S. D. und Lupski J. R. (2009) The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet*, **41**, 849-53.
- Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., Nithipatikom K., Vasquez-Vivar J. und Kalyanaraman B. (2003) Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med*, **34**, 1359-68.



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b> Energiedeposition von Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen	<b>S.10</b>
<b>Abbildung 1.2:</b> Schematische Darstellung der Energiedeposition verschiedener Strahlenqualitäten in Abhängigkeit der Eindringtiefe in Wasser.	<b>S.10</b>
<b>Abbildung 1.3:</b> Mikroskopischer Vergleich der Teilchenspuren von Protonen und Kohlenstoff-Ionen gleicher Energien vor und hinter dem Bragg-Maximum.	<b>S.12</b>
<b>Abbildung 1.4:</b> Poisson-Verteilung der Teilchendurchgängen pro Fibroblastenzellkern.	<b>S.14</b>
<b>Abbildung 1.5:</b> Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung.	<b>S.15</b>
<b>Abbildung 1.6:</b> Schematischer Aufbau des Bindegewebes.	<b>S.17</b>
<b>Abbildung 1.7:</b> Morphologische Differenzierungsstadien von Fibroblasten.	<b>S.18</b>
<b>Abbildung 1.8:</b> Zellzyklus der eukaryontischen Zelle.	<b>S.19</b>
<b>Abbildung 1.9:</b> Strahleninduzierte genomische Instabilität in Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen.	<b>S.24</b>
<b>Abbildung 1.10:</b> Physiologische ROS-Erzeugung sowie deren Neutralisierung.	<b>S.27</b>
<b>Abbildung 2.1:</b> Experimenteller Ablauf der Bestrahlung und anschließenden Kultivierung der Zellen zur Untersuchung der genomischen Stabilität in den Nachkommen ursprünglich bestrahlter Zellen.	<b>S.36</b>
<b>Abbildung 2.2:</b> Bestrahlungskammer für Bestrahlungen an der Mikrosonde.	<b>S.39</b>
<b>Abbildung 2.3:</b> Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Hoechst 33342-gefärbter Zellkerne eines Bestrahlungsfeldes der Mikrosonde.	<b>S.40</b>
<b>Abbildung 2.4:</b> Reaktionsschema für DCFHDA.	<b>S.43</b>
<b>Abbildung 2.5:</b> Reaktionsschema der DHE-Oxidation durch das Superoxid-Anion.	<b>S.44</b>
<b>Abbildung 2.6:</b> Durchflusszytometrischen Messung intrazellulärer ROS-Mengen.	<b>S.46</b>
<b>Abbildung 2.7:</b> mFISH-gefärbte Metaphase.	<b>S.55</b>
<b>Abbildung 2.8:</b> Reziproke Translokation mFISH-gefärbter Chromosomen.	<b>S.56</b>
<b>Abbildung 2.9:</b> Translokation eines mBAND-gefärbten Chromosom 2.	<b>S.57</b>
<b>Abbildung 2.10:</b> Schematische Darstellung verschiedener chromosomaler Aberrationstypen, modifiziert nach Evans (Evans 1974).	<b>S.60</b>
<b>Abbildung 2.11:</b> Repräsentativer „In Cell Western“ der vorliegenden Arbeit.	<b>S.65</b>
<b>Abbildung 3.1:</b> Proliferation von NHDF-Zellen drei unabhängiger Experimente.	<b>S.70</b>
<b>Abbildung 3.2:</b> Giemsa-Analysen von NHDF-Zellen.	<b>S.72</b>
<b>Abbildung 3.3:</b> Anteile aberranter Metaphasen in NHDF-Zellen aus mFISH-Analysen.	<b>S.74</b>
<b>Abbildung 3.4:</b> (a) Anteile aberranter Metaphasen und (b) Aberrationen pro Metaphase aller Experimente mit NHDF-Zellen aus mFISH-Analysen.	<b>S.75</b>
<b>Abbildung 3.5:</b> Entwicklung klonaler Aberrationen in NHDF-Zellen.	<b>S.76</b>
<b>Abbildung 3.6:</b> (a) mFISH-gefärbter Karyotyp von NHDF-Zellen (b) mBAND- und mFISH-gefärbte Chromosomen 17.	<b>S.69</b>
<b>Abbildung 3.7:</b> Aneuploidie in NHDF-Zellen.	<b>S.79</b>
<b>Abbildung 3.8:</b> Western-Blots der Proteinexpression in NHDF-Zellen.	<b>S.81</b>
<b>Abbildung 3.9:</b> Relative Akkumulation von ROS in NHDF-Zellen.	<b>S.83</b>
<b>Abbildung 3.10:</b> Proliferation von IMR-90-Zellen.	<b>S.84</b>
<b>Abbildung 3.11:</b> Giemsa-Analysen von IMR-90-Zellen.	<b>S.85</b>
<b>Abbildung 3.12:</b> mFISH-Analysen von IMR-90-Zellen.	<b>S.86</b>
<b>Abbildung 3.13:</b> Strukturellen Aberrationen in IMR-90-Zellen aus mFISH-Analysen unter Berücksichtigung der Klonalität.	<b>S.87</b>
<b>Abbildung 3.14:</b> Stammbaum klonaler Aberrationen in IMR90-Zellen (Exp.1).	<b>S.88</b>
<b>Abbildung 3.15:</b> Stammbaum klonaler Aberrationen in IMR90-Zellen (Exp. 3).	<b>S.89</b>
<b>Abbildung 3.16:</b> (a) mFISH gefärbter Karyotyp einer IMR-90-Metaphase aus Experiment 3 und (b) mBAND-gefärbte Chromosomen 9 aus Experiment 1.	<b>S.90</b>
<b>Abbildung 3.17:</b> Telomer- und mFISH- gefärbte Metaphase des in Abbildung 3.16a dargestellten Karyotyps.	<b>S.91</b>
<b>Abbildung 3.18:</b> Western-Blots der Proteinexpression in IMR-90-Zellen.	<b>S.92</b>
<b>Abbildung 3.19:</b> Relative Akkumulation von ROS in IMR-90-Zellen.	<b>S.93</b>

<b>Abbildung 3.20:</b> Proliferation von AG1522D-Zellen.	<b>S.94</b>
<b>Abbildung 3.21:</b> Giemsa- und mFISH-Analysen in AG1522D-Zellen.	<b>S.94</b>
<b>Abbildung 3.22:</b> Western-Blot der Proteinexpression in AG1522D-Zellen.	<b>S.95</b>
<b>Abbildung 3.23:</b> Relative Akkumulation von ROS in AG1522D-Zellen.	<b>S.96</b>
<b>Abbildung 3.24:</b> Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit Röntgenstrahlung und Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u].	<b>S.99</b>
<b>Abbildung 3.25:</b> Giemsa-Analysen schein-bestrahlter Zellen aller Experimente.	<b>S.100</b>
<b>Abbildung 3.26:</b> mFISH-Analysen schein-bestrahlter Zellen aller Experimente.	<b>S.101</b>
<b>Abbildung 3.27:</b> Giemsa-Analysen mit Röntgenstrahlung bestrahlter Fibroblasten.	<b>S.104</b>
<b>Abbildung 3.28:</b> mFISH-Analysen mit einer Röntgendosis von 2 Gy bestrahlter Zellen.	<b>S.106</b>
<b>Abbildung 3.29:</b> mFISH-Analysen mit einer täglich fraktionierten Dosis von 8x2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlter Zellen.	<b>S.107</b>
<b>Abbildung 3.30:</b> mFISH-gefärbte Karyotypen der Nachkommen mit 8x2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlter Zellen.	<b>S.109</b>
<b>Abbildung 3.31</b> mFISH-Analysen 44 h nach gezielter Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern.	<b>S.112</b>
<b>Abbildung 3.32:</b> Giemsa-Analysen der Kolonien ursprünglich mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen.	<b>S.113</b>
<b>Abbildung 3.33:</b> mFISH-Analysen der Nachkommen mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen.	<b>S.114</b>
<b>Abbildung 3.34:</b> mFISH-Analysen der Nachkommen mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG1522D-Zellen.	<b>S.116</b>
<b>Abbildung 3.35:</b> Ergebnisse des In-Cell-Western in mitotisch aktiven Kolonien.	<b>S.119</b>
<b>Abbildung 3.36:</b> Ergebnisse des In-Cell-Western in postmitotischen aktiven Kolonien.	<b>S.121</b>
<b>Abbildung 3.37:</b> Zeitliche Entwicklung der PDs schein-bestrahlter und gezielt mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Zellen in Massenkulturen.	<b>S.123</b>
<b>Abbildung 3.38:</b> mFISH-Analysen schein-bestrahltenr sowie aus mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Einzelzellen in Massenkulturen.	<b>S.124</b>
<b>Abbildung 3.39:</b> Western-Blots zellulärer Proteinmengen in Massenkulturen schein-bestrahlter und mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten Fibroblasten.	<b>S.126</b>
<b>Abbildung 3.40:</b> Relatives klonogenes Zellüberleben von (a) IMR-90-, (b) WI-38- und (c) AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung, niederenergetischen [9,8 MeV/u] oder hochenergetischen [100 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen.	<b>S.129</b>
<b>Abbildung 3.41:</b> Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in IMR-90-Zellen nach Bestrahlung mit (a) Röntgenstrahlung, (b) hochenergetischen [100 MeV/u] und (c) niederenergetischen [9,8 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen.	<b>S.131</b>
<b>Abbildung 3.42:</b> Abhängigkeit der relativen (a) DCF- oder (b) DHE-Fluoreszenz von der Strahlenqualität und Höhe der Dosis in IMR-90-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen ROS-Akkumulation 3 Tage nach der Bestrahlung.	<b>S.132</b>
<b>Abbildung 3.43:</b> Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in WI-38-Zellen nach Bestrahlung mit (a) Röntgenstrahlung, (b) hochenergetischen [100 MeV/u] und (c) niederenergetischen [9,8 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen.	<b>S.134</b>
<b>Abbildung 3.44:</b> Abhängigkeit der relativen (a) DCF- oder (b) DHE-Fluoreszenz von der Strahlenqualität und Höhe der Dosis in WI-38-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen ROS-Akkumulation 3 Tage nach der Bestrahlung.	<b>S.135</b>
<b>Abbildung 3.45:</b> Zeitliche Entwicklung der ROS-Akkumulation in AG1522D-Zellen nach Bestrahlung mit (a) Röntgenstrahlung, (b) hochenergetischen [100 MeV/u] und (c) niederenergetischen [9,8 MeV/u] Kohlenstoff-Ionen.	<b>S.136</b>
<b>Abbildung 3.46:</b> Abhängigkeit der relativen (a) DCF- oder (b) DHE-Fluoreszenz von der Strahlenqualität und Höhe der Dosis in AG1522D-Zellen zum Zeitpunkt der maximalen ROS-Akkumulation 3 Tage nach der Bestrahlung.	<b>S.137</b>
<b>Abbildung 3.47:</b> Relative DCF- oder DHE-Fluoreszenzintensitäten in Langzeitkulturen von bestrahlten (a) AG1522D-, (b) WI-38- und (c) NHDF-Zellen.	<b>S.139</b>
<b>Abbildung 4.1:</b> Dysfunktionale Telomere führen zu BFB-Zyklen und genomischer Instabilität.	<b>S.146</b>

<b>Abbildung 4.2:</b> Korrelation von Seneszenz und Tetraploidie in NHDF- und IMR-90-Zellen.	<b>S.148</b>
<b>Abbildung 4.3:</b> Möglichen Auswirkungen dysfunktionaler Telomere.	<b>S.154</b>
<b>Abbildung 4.4:</b> Mechanismus der BIR, modifiziert nach Royle (Royle <i>et al.</i> 2008).	<b>S.155</b>
<b>Abbildung 4.5:</b> Idealisierte Darstellung der Langzeitentwicklung der PDs und relativen zellulären Proteinmengen in Fibroblasten über die Kultivierungsdauer.	<b>S.157</b>
<b>Abbildung 4.6:</b> Klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung von AG1522D-Zellen mit Röntgenstrahlung.	<b>S.165</b>
<b>Abbildung 4.7:</b> Experimentelles und theoretisches klonogenes Zellüberleben nach Bestrahlung von AG1522-Zellen mit Kohlenstoff-Ionen.	<b>S.166</b>
<b>Abbildung 4.8:</b> Mittlere durchlaufene PDs aller AG1522D-Zellen in Kolonien.	<b>S.171</b>
<b>Abbildung 4.9:</b> (a) Mittlere Anteile aberranter Metaphasen pro Kolonie der Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen mit instabilen Aberrationen aus Giemsa-Analysen sowie sporadischen chromosomalen Aberrationen (cA) aus mFISH-Analysen der vorliegenden Arbeit. (b) Mittlere Anteile instabiler Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter bestrahlter AG5122D-Zellen.	<b>S.172</b>
<b>Abbildung 4.10:</b> Anteile von Kolonien der Nachkommen schein-bestrahlter und bestrahlter AG1522D-Zellen mit sporadisch entstandenen klonalen Aberrationen.	<b>S.174</b>
<b>Abbildung 4.11:</b> Beteiligung aller Chromosomen an spontan entstandenen klonalen Aberrationen in Kolonien aller schein-bestrahlten und bestrahlten AG1522D-Zellen.	<b>S.176</b>
<b>Abbildung 4.12:</b> Anteile von Kolonien mit strahleninduzierten klonalen Aberrationen aller analysierten Kolonien der Nachkommen mit Röntgenstrahlung bestrahlter Zellen.	<b>S.178</b>
<b>Abbildung 4.13:</b> Anteile aller „stabilen Zellen“, die 44 h nach der Bestrahlung mit einem Kohlenstoff-Ion [4,8 MeV/u] strahleninduzierte chromosomale Aberrationen (cA) zeigten und Anteile aller Kolonien der Nachkommen von AG1522D-Zellen, die mit einem oder fünf Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlt wurden und strahleninduzierte klonale Aberrationen in allen Metaphasen zeigten.	<b>S.180</b>
<b>Abbildung 4.14:</b> Mittlere Anteile schein-bestrahlter oder mit Kohlenstoff-Ionen [4,8 MeV/u] bestrahlte AG1522D-Zellen in Kolonien mit mitotischen (MFII/III) oder postmitotischen (PMFs) morphologischen Differenzierungsmustern.	<b>S.182</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> In der vorliegenden Arbeit verwendete Fibroblasten.	<b>S.31</b>
<b>Tabelle 3.1:</b> Maximal erreichte PDs und Tage nach Beginn der Kultivierung zum Zeitpunkt des Einsetzens der replikativen Seneszenz in NHDF-Zellen.	<b>S.71</b>
<b>Tabelle 3.2:</b> Maximal erreichte PDs und Tage nach Beginn der Kultivierung zum Zeitpunkt des Einsetzens der replikativen Seneszenz in IMR-90-Zellen.	<b>S.84</b>
<b>Tabelle 3.3:</b> Klonale Aberrationen in Kolonien schein-bestrahlter Zellen.	<b>S.102</b>
<b>Tabelle 3.4:</b> Klonale Aberrationen in Kolonien aller mit ursprünglich 2 Gy Röntgenstrahlung bestrahlten Zellen.	<b>S.106</b>
<b>Tabelle 3.5:</b> Klonale Aberrationen in Kolonien ursprünglich mit einer fraktionierten Bestrahlung von Röntgenstrahlung á 8x2 Gy bestrahlten Zellen.	<b>S.108</b>
<b>Tabelle 3.6:</b> Klonale Aberrationen in Kolonien der Nachkommen von Einzelzellen, die mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden.	<b>S.115</b>
<b>Tabelle 3.7:</b> Klonale Aberrationen in Kolonien der Nachkommen von Einzelzellen, die mit fünf Kohlenstoff-Ionen [1 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlt wurden.	<b>S.117</b>
<b>Tabelle 3.8:</b> Transmissible Aberrationen aus mFISH-Analysen der Nachkommen schein-bestrahlter oder mit einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] bestrahlten AG5122D-Zellen in Massenkulturen, die zu unterschiedlichen Analysenzeitpunkten detektiert wurden.	<b>S.125</b>
<b>Tabelle 4.1:</b> Mittlere Werte der Tage nach Beginn der Kultivierung und maximal erreichten PDs zum Zeitpunkt des Einsetzens der replikativen Seneszenz aller Experimente der untersuchten Fibroblastenlinien aus der vorliegenden Arbeit.	<b>S.142</b>
<b>Tabelle 4.2:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse aus mFISH-Analysen der vorliegenden Arbeit 44 h nach gezielter Bestrahlung von Fibroblasten mit genau einem Kohlenstoff-Ion [0,2 Gy; 4,8 MeV/u] pro Zellkern.	<b>S.168</b>
<b>Tabelle 4.3:</b> Vergleich der der Langzeitentwicklung der Nachkommen bestrahlter AG1522-Zellen aus der vorliegenden sowie anderen Arbeiten (Winter 2007, Fournier <i>et al.</i> 2007, Zahnreich <i>et al.</i> 2010).	<b>S.184</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>AESF</b>	4-(2-Aminoäthyl)-benzolsulfonfluorid
<b>BFB</b>	Bruch-Fusion-Bruch-Zyklus (breakage-fusion-bridge)
<b>BIR</b>	Bruch-induzierte replikation („break-induced replication“)
<b>BrdU</b>	5-Bromo-2'-deoxyuridin
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
<b>CCD</b>	ladungsträgergekoppelte Schaltung (charge coupled device)
<b>CDK</b>	Cyclin-abhängige Kinase (Cyclin Dependent Kinase)
<b>DAPI</b>	4,6-Diamino-2-phenyl-indol
<b>DCF</b>	2',7'-Dichlorofluorescein
<b>DCFH</b>	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein
<b>DCFH-DA</b>	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat
<b>DHE</b>	Dihydroethidium
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
<b>EBSS</b>	Earle's Balanced Salt Solution
<b>EDTA</b>	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
<b>EMEM</b>	Eagle's Minimum Essential Medium
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
<b>LET</b>	linearer Energietransfer
<b>mBAND</b>	Multicolor Banding
<b>MF</b>	mitotischer Fibroblast
<b>mFISH</b>	Multiplex Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
<b>mtDNA</b>	mitochondriale DNA
<b>PBS<sup>-/-</sup></b>	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline) ohne Ca und Mg
<b>PCC</b>	frühzeitige Chromosomenkondensation (Premature Chromosome Condensation)
<b>PD</b>	Populationsverdopplungen
<b>PE</b>	Plattierungseffizienz („plating efficiency“)
<b>PMF</b>	postmitotischer Fibroblast
<b>PNA</b>	Peptid-Nukleinsäure (peptide nucleic acid)
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>QFISH</b>	quantitative Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
<b>RBW</b>	relative biologische Wirksamkeit
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
<b>SIS</b>	Schwerionensynchrotron
<b>SSC</b>	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (Sodiumchloride-Sodiumcitrate-Buffer)
<b>SSCT</b>	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Tween 20-Puffer (Sodiumchloride-Sodiumcitrate-Tween 20-Buffer)
<b>TBST</b>	TRIS-gepufferte Tween-20 Salzlösung (Tris-Buffered Saline Tween-20)
<b>TRIS</b>	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
<b>UNILAC</b>	Linearbeschleuniger (Universal Ion Linear Accelerator)
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Sebastian Zahnreich  
Sindlinger Straße 2  
60326 Frankfurt am Main  
geboren am 14.04.1978 in Hadamar

### Schulbildung

1988 – 1996      Gymnasialer Zweig der Fürst-Johann-Ludwig-Schule, Hadamar,  
Abschluss: mittlere Reife

### Berufsausbildung

09.1998 – 09.2000      Ausbildung als Biologisch-technischer Assistent an der Europa-  
Fachhochschule Fresenius, Idstein.  
Abschluss: Staatlich geprüfter Biologisch-technischer Assistent

### Hochschulstudium

10.2002 – 01.2007      Studium der Biotechnologie an der Fachhochschule Darmstadt. Titel der  
Diplomarbeit: „Spontane und strahleninduzierte Chromosomenschäden und  
genetische Instabilität in Langzeitkulturen verschiedener humaner  
Fibroblastenlinien.“ Abschluss: Dipl. Ing. Biotechnologie (FH)

### Berufstätigkeit

10.2000 – 10.2002      Biologisch-technischer Assistent am Institut für Molekulare Zellbiologie  
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Seit 07.2007      Anfertigung einer Dissertation am Helmholtzzentrum für Schwerionenfor-  
schung, Abteilung Biophysik, Darmstadt.  
Titel der Dissertation: „Untersuchungen zur genomischen Stabilität in norma-  
len humanen Fibroblasten nach Einwirkung von dicht-ionisierender Strahlung.“

Frankfurt, den 07. Dezember 2010

## **Erklärung gemäß §9 der Promotionsordnung**

Hiermit erkläre ich gemäß § 9 der Allgemeinen Bestimmungen der Promotionsordnung der Technischen Universität Darmstadt vom 12. Januar 1990 in der Fassung der IV. Änderung vom 16. August 2001, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur genetischen Stabilität von normalen humanen Fibroblasten nach Einwirkung von dicht-ionisierender Strahlung“ selbständig verfasst und bei ihrer Anfertigung keine außer den ausdrücklich genannten Hilfsmitteln benutzt habe.

Frankfurt, den 07. Dezember 2010

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2007 bis Dezember 2010 in der Abteilung Biophysik der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Kraft und Herrn Prof. Dr. Marco Durante angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerhard Kraft für meine Aufnahme in die Arbeitsgruppe Biophysik der GSI Darmstadt, die diese Disssertation erst ermöglichte.

Herr Prof. Dr. Marco Durante danke ich für die Bereitstellung als erster Berichterstatter sowie das rege Interesse und die Unterstützung meiner Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Marcus Löbrich, der freundlicherweise das Amt des Mitberichterstatters übernommen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Claudia Fournier für die Betreuung dieser Arbeit. Ihre Unterstützung, Engagement und umfangreiches Fachwissen waren eine sehr große Motivation und Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. Sylvia Ritter, die mir mit großer fachlicher Kompetenz ein stetiger Ansprechpartner bei großen und kleinen Problemen war.

Bei Larissa Melnikova möchte ich mich für die Auswertung von Giemsa-gefärbten Chromosomenpräparaten, die für die vorliegende Arbeit analysiert wurden und diese außerordentlich bereicherten, bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Petra Hessel, Jan Knoop und Milena Parlak für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Experimenten und Monika Frenzel für die Bereitstellung bestrahlter Zellen aus Langzeitkulturen für Messungen zellulärer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Kay-Obbe Voss und Bruno Merk für die Unterstützung und die Durchführungen der Mikrosonden-Bestrahlungen sowie bei Wolfgang Becher und Günther Lenz für die technische Unterstützung an den weiteren Bestrahlungsplätzen bedanken.

Bei Dr. Thomas Friedrich möchte ich mich für die Berechnung des theoretischen zellulären Überlebens von Fibroblasten nach gezielter Bestrahlung mit Ionen bedanken.



Allen Mitgliedern der Abteilung Biophysik danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Zeit meiner Ausbildung und des Studiums und vor allem während dieser Promotion sehr unterstützt haben.